



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS CON
ESPECIALIZACION EN PARASITOLOGIA

**“SECUENCIACION TRANSCRIPTOMICA DEL GEN DE LA SIALIDASA (SA),
DE AISLADOS DE *Trypanosoma rangeli* QUE TIENEN Y NO TIENEN
ACTIVIDAD ENZIMATICA”**

PRESENTADA POR
LICDA TANIA GOMEZ TEM

DIRECTOR DE TESIS
DR AZAEL SALDAÑA

2016

Siempre parece imposible, hasta que se hace

Nelson Mandela

57

03 APR 2018

**UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS CON
ESPECIALIZACION EN PARASITOLOGIA
HOJA DE APROBACION**

**“SECUENCIACION TRANSCRIPTOMICA DEL GEN DE LA SIALIDASA (SA),
DE AISLADOS DE *Trypanosoma rangeli* QUE TIENEN Y NO TIENEN
ACTIVIDAD ENZIMATICA”**

DIRECTOR

DR AZAEL SALDAÑA _____

Departamento de Microbiologia humana

Universidad de Panama

Tesis presentada para optar por el Grado de Master en Ciencias

Biomedicas con Especializacion en Parasitologia

Por la Licenciada Tania Gomez Tem

2016

obsequio del autor

DEDICATORIA

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos ademas de su infinita bondad y amor

A mi madre Elizabeth

Por haberme apoyado en todo momento por sus consejos sus valores por la motivacion constante que me ha permitido ser una persona de bien pero mas que nada por su amor

A mis familiares

A mi querido hijo por apoyarme a su manera comprendiendo porque no le podia dedicar todo el tiempo que el deseaba y a la vez *para que veas en mi un ejemplo a seguir* a mi prima Sandy dandome fortaleza para terminar mi objetivo a mi tío Omar y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboracion de esta tesis

¡Gracias a ustedes!

A mis profesores y amigos *aquellos que marcaron cada etapa de mi camino universitario y que me ayudaron en asesorias y dudas presentadas en la elaboracion de la tesis*

Dra Gloria Gonzalez por su gran apoyo y motivacion para la culminación de esta meta profesional y para la elaboracion de esta tesis al Dr Azael Saldaña por su apoyo ofrecido en este trabajo a la vez sus sabios consejos y con ello poder culminar mi proyecto de tesis igualmente a el Dr Franklin Samudio por toda su colaboracion y a todos que desinteresadamente siempre estuvieron arrietandome para que esta meta se hiciera realidad

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTO

Así quiero mostrar mi gratitud a todas aquellas personas que estuvieron presentes en la realización de esta meta de este sueño que es tan importante para mí agradecer todas sus ayudas sus palabras motivadoras sus conocimientos sus consejos y su dedicación

Muestro mis más sinceros agradecimientos a mis asesores de este gran proyecto a la Dra Gloria Gonzalez quien con su vasto conocimiento y su guía fue una pieza clave para que pudiera desarrollar una línea de hechos que fueron imprescindibles para cada etapa de desarrollo del trabajo Igualmente al Dr Azael Saldaña por sus sabios consejos que me ayudaron a terminar satisfactoriamente esta investigación

A mis compañeros y profesores quienes a través de tiempo fuimos fortaleciendo una amistad y creando una familia muchas gracias por toda su colaboración por convivir todo este tiempo conmigo por compartir experiencias alegrías frustraciones tristezas peleas celebraciones o apoyándome e impulsándome para que siguiese adelante y múltiples factores que ayudaron a que hoy seamos como una familia por aportarme confianza y por crecer juntos en este proyecto muchas gracias

Por último quiero agradecer a la base de todo a mi familia en especial a mis padres a mi hijo Ethan que quienes con sus consejos fueron el motor de arranque y mi constante motivación muchas gracias por su paciencia y comprensión y sobre todo por su amor

¡Muchas gracias por todo!

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN	2
CAPITULO I GENERALIDADES DE LA INVESTIGACION	4
INTRODUCCION	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
JUSTIFICACION Y USO DE LOS RESULTADOS	9
CAPITULO II FUDAMENTACION TEORICA	11
GENERALIDADES DEL PARASITO	12
Ciclo de vida	13
Vectores	15
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
CAPITULO III MATERIALES Y METODOS	21
1 Muestra	22
1 1 Procedencia de las muestras	22
1 2 Cultivo de cepas	22
1 3 Medicion de la actividad enzimatica de SA	22
2 Extraccion de RNA	23
2 1 Principio	23
2 2 Procedimiento	23
2 3 Cuantificacion de RNA	25
4 Clonacion	31
4 1 Vector	31
4 2 Ligacion	31
5 Preparacion de medios de cultivo y soluciones de trabajo	32
5 1 Stock de ampicilina 10 mg/MI	32
5 2 Solucion stock IPTG 0 1 M	32
Stock 2M Mg ²⁺	32
Stock 2M glucosa	32
5 3 LB Broth	32
5 4 Agar LB	32

5 5 Agar LB con ampicilina 100 µg/mL	33
5 6 Agar LB con ampicilina/IPTG	33
5 7 Medio SOC	33
6 Transformacion	34
6 1 Preparacion de celulas competentes	34
6 2 PCR de colonias	34
6 3 Preparacion de minipreps	34
7 Secuenciacion	35
8 Analisis de resultados	36
CAPITULO IV RESULTADOS	37
1 MUESTRA	38
2 Extraccion de ARN	38
2 1 Cuantificacion de RNA	38
2 2 Purificacion de mRNA	39
2 3 Sintesis de cDNA a partir del mRNA RT-PCR	39
4 Clonacion	42
4 1 Vector	43
4 2 Ligacion	43
Reaccion de Clonacion	44
4 3 Transformacion	44
5 Preparacion de Minipreps	46
6 Secuenciacion	47
8 Analisis de resultados	48
CAPITULO V DISCUSION	54
CAPITULO VI CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	66

IV.ÍNDICE DE FIGURAS

FIG 1 Dist geografica de Trypanosoma rangeli y sus vectores en las Americas Central y del Sur	13
FIG 2 Diseno esquematico del ciclo biológico de Trypanosoma (Herpetosoma)	14
FIG 3 Cuantificacion del RNA	25
FIG 4 Purificacion de RNA	26
FIG 5 Calidad de RNA	26
FIG 6 Random primers (RP) (Invitrogen)	27
FIG 7 Flujo de trabajo para Minipreps	35
FIG 8 Muestras de cDNA de 028 y JB con Random primers Oligodt y primers especificos AB	40
FIG 9 Gel de agarosa al 1% visualizando los cDNA	42
FIG 10 vector de propagacion pGEM T Easy (Promega)	42
FIG 11 Productos de ligacion que muestra que esta el inserto en c/d producto	44
FIG 12 Tubos eppendorf con clones ya separados para sembrar Platos Petri	45
FIG 13 Cultivo de clones de celulas transformadas	46
FIG 14 PCR para comprobar que tenemos el plasmido	46
FIG 15 30 clones de ambos aislados	47
FIG 16 Secuencias nucleotidicas de los consensos de 028 y JB	51
FIG 17 Secuencias de aminoacidos con respecto a nuestros dos consensus (028 y JB)	52
FIG 18 Secuencias de nucleotidos	53

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN copia

ARN ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

CDS secuencia codificante

dNTP mezcla de dATP dTTP dGTP y dCTP

d p i días post infección

EST Expressed Sequence Tag (secuencia parcial de un clon de ADNc)

Gal galactosa

GPI glicofosfatidilinositol

GST glutathione-S transferasa

HV Hipervariable

IR región intergenica

KDa kilodaltons

Kpb kilopares de bases

NAcGal N-acetilgalactosamina

NAcGlc N-acetilglucosamina

PAGE electroforesis en geles de poliacrilamida

pb pares de bases

PCR reacción en cadena de la polimerasa

SA Sialidasa

SDS dodecilsulfato de sodio

Tm temperatura media de desnaturalización de un ácido nucleico

Tr *Trypanosoma rangeli*

Tc *Trypanosoma cruzi*

TS Trans-sialidasa

TrSA Sialidasa de *Trypanosoma rangeli*

TSTc Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*

TrSAi Sialidasa de *Trypanosoma rangeli* sin actividad enzimática

TrSAS Sialidasa de *Trypanosoma rangeli* con actividad enzimática

V. RESUMEN

RESUMEN

Trypanosoma rangeli (T r) y *Trypanosoma cruzi* (T c) son protozoos parásitos que guardan profundas relaciones biológicas, bioquímicas e inmunológicas. Ambos son encontrados en infecciones mixtas en humanos y presentan reactividad inmunológica cruzada. Por esta razón, los estudios sobre el *T. rangeli* se han encaminado tanto al desarrollo de herramientas diagnósticas que permitan su diferenciación de *T. cruzi* así como al análisis de genes o productos de *T. rangeli* que sean relevantes dentro del contexto de su asociación con *T. cruzi* y la relación hospedador-vector.

Por mucho tiempo se ha postulado que la infección con *T. rangeli* puede modificar el curso normal de la infección chagásica. Esto se ha podido comprobar a nivel experimental en animales infectados o inmunizados con antígenos de *T. rangeli*. Estos modelos experimentales presentan menores patologías al ser retados con inoculos de *T. cruzi*. La interacción entre estos parásitos es compleja y a la fecha resta mucho por entender sobre ella. Estudios anteriores han demostrado que *T. rangeli* expresa una enzima llamada sialidasas (Tersa) la cual no es similar a la trans-sialidasas (TS) encontrada en *T. cruzi* (Tacs) y a la vez esta se encuentra prominentemente en el estadio de epimastigotas.

Pereira y Moss (1985) informo sobre una actividad de una neuraminidasa presente en *T. rangeli* diferente de una enzima relacionada presente en *T. cruzi*. Estos autores que trabajan con poblaciones de El Salvador, Costa Rica, Panamá y encontraron que todas las cepas de *T. rangeli* estudiadas muestran actividad de la neuraminidasa y llegaron a la conclusión de que la liberación de la enzima era probable por un proceso de secreción. Trabajo adicional sobre la sialidasas (SA) ha demostrado que no es una trans sialidasa (TSA) como en *T. cruzi* (Buschiazzi y col. 1993) y que se expresa prominentemente en la fase epimastigotas.

Nuestro proyecto de investigación brindará información sobre las características a nivel de mRNA de aquellos aislados de *T. rangeli* que tienen y no tienen actividad

de sialidasa del gen (SA) en los aislados de *T. rangeli* a trabajar. Para este fin se analizaron 2 aislados de *T. rangeli*, uno con actividad enzimática de SA y otro sin actividad (suministrados por el CIDEP).

La actividad de sialidasa fue medida mediante la técnica de MU NANA (Shottelius J 1987).

Se cuantificó la concentración de RNA total y mRNA de cada producto. Posteriormente se clonó en el vector de propagación pGEM-T Easy (Promega) (Sanbrook J Russell DW 2006) y seguidamente fueron secuenciados por el método de Dideoxi Nucleótidos marcados en el secuenciador automático 3130 Genetic Analyzer Sanger 1977 (Applied Biosystem).

Los datos fueron depurados, consolidados, analizados y presentados a fin de obtener datos vigentes para determinar las diferencias en aislados de *T. rangeli* que tienen actividad enzimática de SA y las que no. Para el análisis de la similitud de nucleótidos y de aminoácidos (aa) de estas secuencias se utilizaron herramientas bioinformáticas tales como Blast en NCBI y EBI (Marañón y col 2000b y Sanbrook y col 2001) donde se pudo observar que nuestros dos aislados poseen identidad de 99% con el gen precursor de sialidasa utilizada por Alejandro Buschiazzi (Buschiazzi y col 1997) pero presentan diferencias en 4 posiciones de aa.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia del estudio de *Trypanosoma rangeli* se enmarca en el contexto de su asociacion con *Trypanosoma cruzi* el agente causal de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una parasitosis caracterizada por la presencia de cardiopatía o daños intestinales. Es de amplia distribución en Centro y Sur America encontrandose unicamente en el hemisferio americano desde Mexico hasta el sur de la Argentina (OMS 2002). *Trypanosoma rangeli* es un parasito comun de mamíferos (incluyendo a el hombre marsupiales roedores y otros animales domesticos y silvestres) encontrados en diferentes áreas geograficas de America Central y Sur America (D'Alessandro A 1976). Este tripanosoma es no patogeno para el hospedero vertebrado no así para el hospedero invertebrado *Rhodnius spp* que en el si tiene efectos patogenos tales como dificultad de la muda y retardo en el desarrollo de las ninfas.

Este parasito a menudo se ha recuperado de la sangre de personas sanas y chagasicos que estan infectadas con ambos parasitos *T. cruzi* y *T. rangeli*. Los estudios inmunologicos tambien han demostrado que estos parasitos parecen compartir fracciones proteicas comunes con propiedades antigenicas que pueden dar lugar a algunas reactividades cruzadas (Basso et al 1989 Saldaña & Sousa 1996). Estas similitudes en moleculas inmunogenicas pueden inducir distorsiones en el diagnostico de la enfermedad de Chagas y podrian ser capaces de inducir algun grado de proteccion inmune contra una infeccion de *T. cruzi* (Guhl et al 1987 Sousa y Saldaña 1994 Zuñiga et al 1997 Palau y col 2003).

Actualmente en Panama las infecciones producidas por *T. rangeli* (*T. r*) se extiende sobre las mismas regiones geograficas que las inducidas por *T. cruzi* (*T. c*) mostrandose mas prevalentes en las áreas rurales de las provincias de Panama y Colon y menos prevalentes en las áreas rurales de otras provincias (Cocle Darien y Bocas del Toro). En Panama las infecciones humanas con *T. r* son 6 veces mas frecuentes que las de *T. c* (Sousa OE y Johnson 1971).

La infeccion por este tripanosoma desencadena una respuesta inmune frente a la misma la cual tradicionalmente se ha estudiado dentro del contexto de *T cruzi*. No obstante esta reactividad cruzada y la inmunomodulacion que ejerce la infeccion por *T r* frente a *T c* han abierto una frontera hacia la utilizacion de *T rangeli* como un modelo en estrategia de potencial inmunoproteccion contra *T cruzi* (Mejia y col 2004)

Estudios previos con ratones BALB/C demostraron que formas epimastigotas fijadas en gluteraldehído de la Cepa 2378 de *T rangeli* no solo inducen respuesta inmune en los animales sino que dicha respuesta es capaz de atenuar la infeccion aguda por cepas virulentas de *T cruzi* disminuyendo los niveles de parasitemia y aumentando la supervivencia de los animales (Basso y col 1991)

Pereira y Moss (1985) informo sobre una actividad de una neuraminidasa presente en *T rangeli* diferente de una enzima relacionada presentes en *T cruzi*. Estos autores que trabajan con poblaciones de El Salvador Costa Rica Panama y encontraron que todas las cepas de *T rangeli* estudiadas muestran actividad de la neuraminidasa y llegaron a la conclusion de que la liberacion de la enzima era probable por un proceso de secrecion. Trabajo adicional sobre la sialidasa (SA) ha demostrado que no es una trans sialidasa (TSA) como en *T cruzi* (Buschiazzo y col 1993) y que se expresa prominentemente en la fase epimastigotes.

Ademas mutaciones puntuales inducidas a traves de experimentos mutagenicos (Buschiazzo A y col 2000) han demostrado que los cambios de un solo aminoacido en la disposicion estructural de la SA de *T rangeli* puede inducir fuertes cambios en la actividad catalitica de esta proteina.

Tambien se demostro que las poblaciones de *T rangeli* se pueden dividir en dos subgrupos fenotipicos uno con una alta actividad de sialidasa y el otro sin actividad detectable (Sousa y col 2005). Y que predominan los aislados con actividad de SA positiva. Aunque el significado de dicha variacion queda por investigar parece que la actividad de SA no es metabolicamente esencial en algunas poblaciones de *T rangeli*.

Utilizando amplificación del ADNk (ADN del Cinetoplasto) en Colombia se han detectado dos grupos de *T rangeli* molecularmente diferentes. Un grupo de cepas aisladas de *Rhodnius prolixus* presentan tres clases de minicirulos en el ADNk denominados KP1, KP2 y KP3, mientras que las cepas aisladas de *Rhodnius colombiensis* presentan solamente dos clases denominados KP2 y KP3. Esta diferencia molecular ha sido evidenciada mediante la técnica de PCR y técnicas de hibridación en más de 50 cepas de diferente origen geográfico en Colombia (Vallejo et al. 2002a, 2003; Urrea et al. 2005).

En Centroamérica las cepas de *T r* KP1(+) se aislaron en áreas de distribución de *R. prolixus* y las cepas de *T r* KP1(-) en áreas de distribución de *R. pallescens* (Salazar Anton et al. 2009).

Así mismo resulta de gran interés el estudio de las características genotípicas de *T rangeli* con el fin de dilucidar el panorama evolutivo, filogenético y biológico de dicho parásito. De esta forma se han utilizado herramientas bioquímicas y moleculares que evidencian variabilidad entre los individuos de esta especie.

Así, nuestro proyecto de investigación tratará de brindar información sobre las secuencias de mRNA que codifican para SA tanto de aquellos aislados de *T rangeli* que tienen actividad enzimática de SA como de los que no tienen actividad enzimática.

JUSTIFICACION Y USO DE LOS RESULTADOS

En las ultimas decadas el estudio de *T rangeli* ha sido enmarcado en el contexto de la biologia y epidemiologia de *T cruzi* tendiente al desarrollo de pruebas diagnosticas que permitan la diferenciacion entre estos dos parasitos asi como al analisis de genes y productos de *T rangeli* que sean relevantes teniendo en cuenta su asociacion con *T cruzi* y la relacion hospedero-parasito (Guhl y Vallejo 2003) Estudios recientes han demostrado como la inmunizacion de ratones y perros con cepas de *T rangeli* inducen una respuesta protectora frente al reto con cepas virulentas de *T cruzi* (Basso y col 2008 2007 2004 Palau y col 2003) siendo de vital importancia la dilucidacion de las proteinas responsables de esta inmunidad cruzada asi como tambien el estudio de las variaciones existentes entre los distintos grupos de *T rangeli*

Ambos parasitos guardan profundas relaciones biologicas bioquimicas e inmunologicas llegando a presentarse infecciones mixtas por estos dos parasitos los cuales presentan reactividad inmunologica cruzada (Anthony RL y col 1979) Por otra parte preguntas fundamentales acerca de *T rangeli* siguen sin respuesta Su posicion taxonomica dentro del subgenero (Herpetosoma) sigue siendo una controversia dadas las caracteristicas biologicas de capacidad de infeccion a un amplio rango de hospedadores y vectores que lo alejan claramente de la especie tipo de este subgenero *Trypanosoma lewisi* La caracteristica biologica compartida con *Trypanosoma brucei* (Subgenero *Trypanozoon*) de completar su ciclo de vida en las glandulas salivales del vector su proximidad filogenetica con *T cruzi* (Subgenero *Schizotrypanum*) y el poder ser transmitido ocasionalmente por las heces del insecto vector (D Alessandro & Saravia 1999) La genomica comparativa es una poderosa herramienta que al ser utilizada entre organismos patogenos filogeneticamente relacionados permite entender los fundamentos bioquimicos relacionados con sus ciclos de vida y las bases

moleculares de las enfermedades que causan en el humano (Vallejo Gustavo y col 2015)

La secuenciación reciente del genoma de la cepa SC-58 de *T rangeli* KP1(-) o genotipo D es la primera lograda en esta especie infectiva no patógena para el humano pero sí para el insecto vector (Stoco y col 2014)

De acuerdo con lo anterior se considera que las cepas de *T rangeli* deben estudiarse lo más pronto posible después de su aislamiento antes de que algunos de sus principales características biológicas pueden llegar a ser modificada

Además el conocimiento sobre los mecanismos bioquímicos o moleculares de la interacción de los tripanosomas y los vectores es aún incompleto por lo tanto es necesario identificar los genotipos de *T rangeli* que son transmitidos por el resto de las 19 especies de *Rhodnius* reconocer la estructura química del factor o factores tripanolíticos y comparar la expresión de los factores inmunes en las especies que presentan actividad tripanolítica o impiden la formación de tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares (Vallejo y col 2015)

También deberá estudiarse el proteoma de las hemolinfas con actividad lítica y sin esta así como el proteoma de las cepas sensibles o resistentes a la actividad lítica para confirmar si la transmisión selectiva se extiende a todas las 19 especies de *Rhodnius*. Nuestro grupo de investigación está adelantando la identificación de proteínas en la hemolinfa de los vectores que podrían estar involucradas en la lisis de los genotipos de *T rangeli* (Suarez et al 2013)

Nuestro proyecto de investigación brindará información sobre la secuencia de mRNA de aquellos aislados de *T rangeli* que tiene y no tienen actividad enzimática de sialidasa. Con el apoyo bioinformático a nivel transcriptómico esto aportará información sobre esta enzima y la relación biológica e inmunológica con la enzima similar del *T cruzi* (Trans-sialidasa). A la vez también tratar de elucidar si existen realmente diferencias Transcriptómicas de este gen (SA) y así poder conocer si existe una mutación puntual u otras mutaciones en los aislados de *T rangeli*

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN

TEÓRICA

GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Trypanosoma rangeli es un protozoo flagelado del hombre y otros vertebrados caracterizado por tener una morfología similar a *Trypanosoma lewisi* especie del subgenero Herpetosoma transmitida principalmente por las heces del vector (D Alessandro & Gore - Saravia 1999)

La forma sanguínea de *T rangeli* es delgada y mide alrededor de 26 a 34 μm de longitud incluyendo el flagelo libre. Tiene un cinetoplasto pequeño y subterminal característica que al microscopio permite diferenciarlo de *T cruzi* al menos en los parásitos con morfología característica. El núcleo está situado cerca a la mitad del cuerpo y la membrana ondulatoria está bien definida (Cuba 1998)

T rangeli se considera un parásito de importancia médica y epidemiológica debido a que presenta alto grado de reactividad inmunológica cruzada con *T cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas interfiriendo en su diagnóstico serológico (Guhl & Vallejo 2003)

Estas similitudes en las moléculas inmunogénicas pueden inducir distorsiones en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y podrían inducir cierto grado de protección inmune contra una infección por *T cruzi* (Guhl y otros 1987 Sousa & Saldaña 1994 Zuñiga y col 1997 Palau y col 2003)



FIG 1 Distribucion geografica de *Trypanosoma rangeli* y sus vectores comprobados en las Americas Central y del Sur

Ciclo de vida

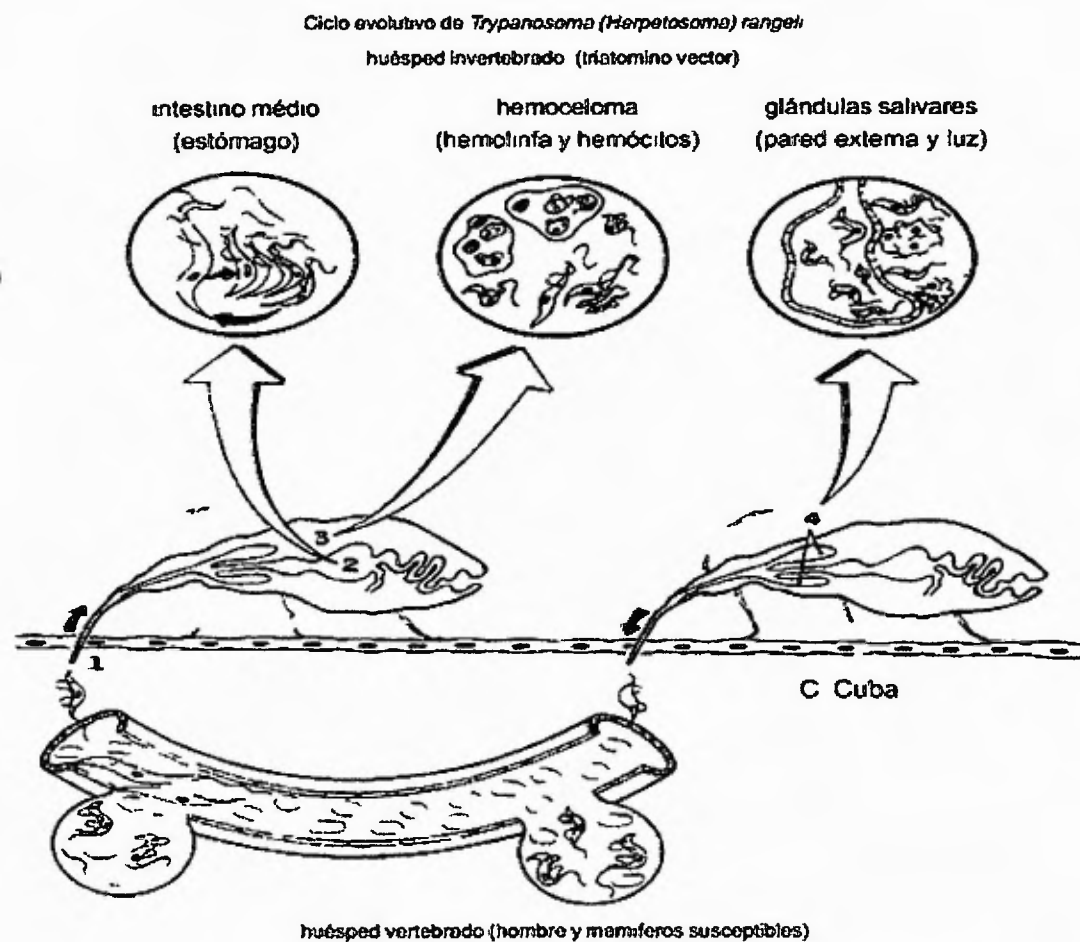
El ciclo de vida esquematico de *T rangeli* que se presenta en la figura 2 se basa primordialmente en las observaciones hechas en *Rhodnius ecuadoriensis* triatomino que circula en Ecuador y Peru y en un modelo murino utilizando cobayas (*Cavia porcellus*) (Cuba 1998)

T rangeli es un parasito tripanosomas con la distribucion geografica practicamente identica como *T cruzi* en America Central y del Sur. Esto impone problemas diagnosticos graves a pesar de compartir muchos rasgos bioquimicos geneticos e inmunologicos los pronosticos de las infecciones humanas son

completamente diferentes (Octavio E Sousa Martza Lombardo Azael Saldaña 2005)

T rangeli ha demostrado ser no patogeno en el huesped mamifero ya que la etapa de sangre tripomastigotes como es incapaz de invadir las celulas huesped de mamíferos

T rangeli se localiza en el vector en la porcion delgada del intestino medio y muy poco en el recto (Guhl & Vallejo 2003)



Diseño esquemático del ciclo biológico de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* en sus huéspedes vertebrado e insecto triatomino vector. Se representan las formas evolutivas más frecuentemente observadas del flagelado

FIG 2 Diseño esquemático del ciclo biológico de *Trypanosoma (Herpetosoma)*

Vectores

Los vectores de *T rangeli* comprobados biologicamente son los triatominos que en condiciones naturales o experimentales tienen capacidad para desarrollar tripomastigotes metaciclicos infectantes en sus glandulas salivares. En 12 de las 15 especies de *Rhodnius* descritas actualmente se ha comprobado el desarrollo de *T rangeli* en las glandulas salivares y su capacidad vectorial a traves de la picadura en condiciones naturales o experimentales (Guhl & Vallejo 2003). En adiccion a estos vectores solo se ha reportado la infeccion natural de *T rangeli* en glandulas salivares de *Triatoma dimidiata* capturados en viviendas humanas de Colombia con transmision para el vertebrado por picadura. La simple presencia de flagelados semejantes a *T rangeli* en el intestino del insecto no constituye una prueba de la capacidad vectorial del insecto pues la evidencia definitiva es la demostracion de los tripomastigotes metaciclicos en las glandulas salivares con capacidad infectiva para el vertebrado (Vallejo et al 2000b).

Aunque carece de patogenicidad para el hombre *T rangeli* siempre se ha estudiado dentro del contexto biologico de *T cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas ya que estos protozoos son simpaticos comparten reservorios vectores y han sido reportados en infecciones mixtas (Guhl & Vallejo 2003, Cuba 1998). Por esta razon los estudios de *T rangeli* se han encaminado tanto al desarrollo de herramientas diagnosticas que permitan la diferenciacion de *T cruzi* como al analisis de genes o productos de *T rangeli* que sean relevantes dentro del contexto de su asociacion con *T cruzi* y la relacion hospedero-vector (GUHL F y col 2002).

Algunos protozoos tripanosomatidos secretan en su medio de cultivo altos niveles de unas enzimas llamadas Sialidasas (SA) que anteriormente se llamaban neuraminidasas (Pereira y Moss 1985). Estas Sialidasas son enzimas hidroliticas presentes desde virus a eucariotas superiores que catalizan la eliminacion de

ácido sialico de glicoconjugados. Estos componentes median una amplia gama de procesos biológicos fundamentales tales como la comunicación célula-célula y eventos de transducción de señales (Franz C K y col 2005) así como participar en una variedad de interacciones hospedador patógeno (Vimr E Lichtensteiger C 2002). Como tal, las sialidasas representan objetivos atractivos para la intervención química en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los organismos eucariotas, ellos no controlan la expresión de sus genes a nivel del inicio de la transcripción sino mediante mecanismos post transcripcionales (Gaston Paris y col 2005).

La SA de *T. rangeli* (Tr SA) fue descrita por Pereira y Moss 1985, hace más de 27 años, pero sus propiedades biológicas y bioquímicas se han mantenido solo parcialmente exploradas. Además de la actividad de trans-sialidación de *T. cruzi*, esta enzima presenta también actividad de Sialidasa, aunque en menor proporción. En *T. rangeli* solo se encuentra esa actividad de Sialidasa (SA) prominentemente en el estadio de epimastigotas (Buschiazzi A y col 1993). Su secuencia N-terminal ha revelado 100% de identidad con la región correspondiente de la trans-sialidasa de *T. cruzi* (TcTSA) (Buschiazzi A, Frasch C 2012). Desde hace 12 años se clonó el gen que codifica para SA. La secuencia deducida de aminoácidos (a a) revelaron un 68.9% de identidad con la región catalítica de la TcTSA (Buschiazzi et al 2000).

Esta enzima (SA) fue inicialmente descrita como sialidasa (Pereira y col 1991) pero más tarde demostró ser más activo en la transferencia reversible α-2,3 ácido sialico unido a un terminal 3-galactosa en glicoconjugados que en hidrolizándolo (Parodi y col 1992).

Además, mutaciones puntuales inducidas a través de experimentos mutagénicos (Buschiazzi et al 2000) han demostrado que los cambios de un solo aminoácido en la disposición estructural de la SA de *T. rangeli* puede inducir fuertes cambios en la actividad catalítica de esta proteína.

En estudios anteriores se ha demostrado que las poblaciones de *T rangeli* se pueden dividir en dos subgrupos fenotípicos uno con una alta actividad de sialidasa y el otro sin actividad detectable (Sousa y col 2005) Sin embargo predominan los aislados con actividad de SA positiva Aunque el significado de dicha variación queda por investigar parece que la actividad de SA no es metabólicamente esencial en algunas poblaciones de *T rangeli*

En este sentido es importante durante la identificación y caracterización de nuevos aislados de *T rangeli* tener cuidado de no excluir a las poblaciones de SA negativos cuando todos los demás caracteres morfológicos biológicos bioquímicos genéticos y epidemiológicos son consistentes con las características de las especies de *T rangeli* (Sousa O y col 2005) Estos hallazgos también deben llamar la atención a la complejidad de la población de parásitos identificadas como *T rangeli*

Debido a las características biológicas inmunológicas y enzimáticas descritas para estas especies Es necesario realizar estudios moleculares con los aislados de *T rangeli* que presenten diferencias fenotípicas En este sentido aquellos aislados sin actividad de sialidasa son particularmente interesantes Investigaciones dirigidas con este fin pueden proveer información sobre la función de esta enzima durante el ciclo celular de *T rangeli* así como su relación inmunobioquímica con la sialidasa/trans-sialidasa de *T cruzi* (Grisard E y col 2010) Dado que la Trans-sialidasa cumple un papel fundamental en el ciclo de vida del *T cruzi* y es exclusiva de tripanosomas es un blanco ideal para el desarrollo de nuevas quimioterapias o inmunoterapias contra los tripanosomas

En los últimos 10 años se han abordado varios estudios genómicos y de transcripción de *T rangeli* con la finalidad de comparar esta información con estudios similares en parásitos patógenos como *T cruzi* *T brucei* y *Leishmania tropica* Se encontró que el genoma de *T rangeli* es el más pequeño y el menos repetitivo de los genomas de las tres especies de tripanosomatídeos que infectan al hombre lo que indica que las familias genicas que responden por la patogenicidad

de *T. cruzi* para el vertebrado se expresan en muy baja proporción en el genoma de *T. rangeli* de forma que este carece del suficiente arsenal de proteínas y enzimas como las MASP y las trans-sialidasas necesarias para invadir las células del mamífero (Vallejo GA, Suarez Y, Olaya JL et al 2010)

La variabilidad genética que presenta *T. rangeli* su patogenicidad para el vector y el hecho de ser infeccioso pero no patógeno para el humano ha estimulado los estudios de transcripción genómica de este parásito con el objetivo de compararlo con *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp. y así entender las bases moleculares de la patogenicidad de estas últimas especies y la ausencia de patogenicidad de *T. rangeli* para el vertebrado. Grisard y col (2010) determinaron el perfil de expresión de *T. rangeli* a partir de la generación de marcadores de secuencias expresadas (expressed sequence tag EST) y una técnica denominada ORESTES que combina los marcos abiertos de lectura (open reading frame ORF) y las EST. Vallejo y colaboradores analizaron 4 208 secuencias a partir de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas SC-58 aislada de Santa Catarina (Brasil) y la Choachi aislada de Cundinamarca (Colombia) representantes de los genotipos KP1(-) y KP1(+) respectivamente (Vallejo GA, Suarez Y, Olaya JL et al 2010). Grisard et al (2010) estimaron en 8 500 el número de genes de *T. rangeli*, confirmaron la cercanía filogenética entre *T. cruzi* y *T. rangeli* e identificaron varios elementos transponibles, genes asociados a la expresión mitocondrial y genes específicos de la edición de ARN.

Hoy en día la genómica comparativa es una poderosa herramienta que al ser utilizada entre organismos patógenos filogenéticamente relacionados permite entender los fundamentos bioquímicos relacionados con sus ciclos de vida y las bases moleculares de las enfermedades que causan en el humano. La secuenciación reciente del genoma de la cepa SC-58 de *T. rangeli* KP1(-) o genotipo D es la primera lograda en esta especie infecciosa no patógena para el humano pero sí para el insecto vector (Stoco Patricia et al 2014). El genoma haploide de *T. rangeli* es hasta hoy el más pequeño y menos variable de los tres

genomas de tripanosomas que infectan al hombre *T. cruzi* 89.9 Mb *T. brucei* 26 Mb y *T. rangeli* 24 Mb. Este genoma de *T. rangeli* fue comparado con el de *T. cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas y se encontraron diferencias entre las cuales se destacan las siguientes:

- 1) *T. rangeli* posee en su genoma menor número de copias de las familias multigenicas consideradas como factores de virulencia en *T. cruzi* tales como las proteínas de superficie asociadas a mucinas (mucin associated surface proteins MASP), trans-sialidasas y mucinas. Las trans-sialidasas en *T. cruzi* remueven el ácido sialico de la superficie de las células del hospedador y lo colocan sobre las moléculas de mucina de la superficie del parásito (Frasch 2000). Esta transferencia de ácido sialico confiere protección al parásito frente a la activación de la cascada del complemento del hospedador. Por el contrario, la sialidasa de *T. rangeli* no permanece unida a la superficie celular del parásito sino que es liberada abundantemente en el medio de cultivo o en el intestino del vector, razón por la cual se sospecha que esta enzima podría alterar la microbiota intestinal y estar involucrada en la patogenicidad comprobada de *T. rangeli* para las especies de *Rhodnius* (Pereira & Moss 1985, Vallejo & Marinkelle 1992, Stoco et al. 2014).
- 2) *T. rangeli* posee en su genoma un reducido repertorio de genes que codifican enzimas de defensa antioxidante de manera que *T. rangeli* es altamente susceptible al estrés oxidativo debido a la presencia de un pequeño número de estas enzimas y proteínas de choque térmico.
- 3) *T. rangeli* posee ortólogos vestigiales de la maquinaria de ARN_i, la cual es varios genes asociados con virulencia en otras especies de cinetoplastidos. Patógenos se encontraron en *T. rangeli* de manera que el significado biológico de la transcripción de estos genes requiere nuevos estudios.

En este estudio analizamos 2 aislados de *T. rangeli*, uno con actividad enzimática de SA y otro sin actividad (suministrados por el CIDEP) medidos por la técnica de MU-NANA. Se extrajo RNA total empleando el Kit RNA Easy QUIAGEN. Se purificó el mRNA con el mRNA Isolation Kit. Se sintetizó cDNA con el kit SUPERScript III REV TRANSCRIPT, Random primers y oligo dT primers de

Life Technologies y luego se amplificó el fragmento que codifica para la SA utilizando Platinum Taq DNA polimerasa de Invitrogen se purificó los productos de PCR y se clonó en el vector pGEM-T Easy Se purificaron los plásmidos se empleó Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Y por último se secuenciaron por el método de Dideoxi Nucleótidos marcados en el secuenciador automático 3130 genetic Analyzer El análisis de la similitud de nucleótidos y de aminoácidos se realizó mediante herramientas bioinformáticas tales como Blast en NCBI y EBI Para contribuir con el objetivo de comparar ambas secuencias del gen de la Sialidasa (SA) en los aislados de *T. rangeli* que tienen actividad enzimática y no actividad enzimática

OBJETIVO GENERAL

- Secuenciar a nivel Transcriptómico el gen de la Sialidasa (SA) en aislados de *T. rangeli* que tienen (TrSAa) y no (TrSAi) actividad enzimática

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar el gen de la Sialidasa a partir de aislados que tienen actividad enzimática (TrSAa) y no (TrSAi) tienen actividad enzimática
- Secuenciar a nivel transcriptómico el gen de la Sialidasa (SA) en los aislados de *T. rangeli* con actividad enzimática (TrSAa) y sin actividad enzimática (TrSAi)
- Comparar ambas secuencias del gen de la Sialidasa (SA) en los aislados de *T. rangeli* que tienen actividad enzimática y no actividad enzimática
- Comparar las secuencias encontradas (TrSAa y (TrSAi) con las descritas para el gen de sialidasa con otras cepas de *T. rangeli*

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Muestra

1.1 Procedencia de las muestras

En nuestro estudio se utilizaron dos aislados de *T rangeli* suministrados por Centro de Investigaciones y Diagnostico de Enfermedades Parasitarias (C I D E P) Universidad de Panama Facultad de Medicina

- JB aislado de humano de la Provincia de Panama Distrito de Chorrera Altos del Jobo Con actividad enzimatica (TrSAS)

-028 aislado de humano de la Provincia de Panama Oeste distrito de Capira Cacao Sin actividad enzimatica (TrSAS_i) (Sousa y col 2005)

1.2 Cultivo de cepas

Los aislados se cultivaron en medio bifásico (Seneckje/salina al 8.5% con estreptomycin-penicilina) (Cazzulo y col 1985) Se cosecharon los epimastigotes de cada aislado en su fase exponencial al día 12 de cultivo se contaron en camara de Neubauer (3×10^8 parasitos /mL) Luego fueron centrifugarlos c/u por 15 minutos a 2500 rpm el pellet de parasitos fue resuspendido en medio de congelacion y almacenado a -80 °C para su posterior uso

1.3 Medicion de la actividad enzimatica de SA en los aislados de *T rangeli*

La actividad enzimatica fue medida en el sobrenadante del cultivo en la fase exponencial de los epimastigotes para lo cual utilizamos el sustrato acido 2(4-methylumbelliferyl)- α - D-N-acetylneuraminic (MU-NANA Sigma St Louis MO) (Shottelius J 1987)

- Se midio 40 μ l de cada muestra

- 10 µl de sustrato (0.025mM de MU-NANA en un buffer a pH 5.5 de acetato de sodio a 100mM)
- Se incubo por 1 hora a 37 °C
- Se detuvo la reaccion agregando 50ul de buffer glicina a pH 10
- Se verifico la fluorescencia con la ayuda de una lampara de luz UV

2 Extraccion de RNA

2.1 Principio

Para la extraccion del RNA total se empleo el Kit RNeasy Mini Cat 74106 de Qiagen el cual emplea el principio de lisis con isotiocianato de guanidina seguido de la purificacion del RNA en columna de silice. El tampon de lisis RLT que contiene una alta concentracion de isotiocianato de guanidina rompe las membranas celulares, desnaturaliza las proteinas incluyendo las RNasas y separa las proteinas del RNA ribosomal, linealiza los acidos nucleicos, ademas de crear las condiciones para la union del RNA a la membrana de silice. El etanol al 70% mantiene el RNA precipitado en tanto que lava las sales que son solubles al 25% en agua. El tampon RW1 es un tampon de lavado fuerte que contiene sales de guanidina y etanol utilizado para eliminar biomoleculas tales como carbohidratos, proteinas y lipidos que se unen de forma no especifica a la membrana. El tampon RPE es un tampon de lavado suave que tambien contiene etanol, cuya funcion es eliminar trazas de sales que aun se mantienen en la columna. Finalmente, el RNA altamente puro es eluido con agua libre de nucleasas.

2.2 Procedimiento

Para la extraccion de RNA a partir de epimastigotes de *T. rangeli* se siguió el protocolo de cultivo celular por centrifugacion descrito por el fabricante, como se detalla a continuacion.

2 2 1 Cada cepa fue procesada por separado. Los botones de parásitos conteniendo 3×10^8 parásitos /mL células fueron resuspendidos en 350 μ L de tampón RLT. La lisis se llevó a cabo con la pipeta aspirando y dispensando varias veces hasta obtener un lisado completamente transparente.

2 2 2 Se añadió un volumen de etanol grado molecular al 70% a cada muestra (350 μ L) y se mezcló varias veces con la pipeta.

2 2 3 El volumen total de cada lisado (aproximadamente 700 μ L) fue transferido a una columna RNeasy spin conteniendo un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó 15 seg a $\geq 10\,000$ rpm. El RNA se unió a la matriz de sílice de la columna RNeasy y el flujo eluido fue eliminado.

2 2 4 Seguidamente se lavó cada columna con 700 μ L de tampón RW1 y se repitió la centrifugación durante 15 seg a $\geq 10\,000$ rpm. Se eliminó el eluido del tubo colector.

2 2 5 Se realizó un segundo lavado con 500 μ L de tampón RPE y se centrifugó nuevamente durante 15 seg a $\geq 10\,000$ rpm. Se eliminó el eluido.

2 2 6 Se repitió el lavado con 500 μ L de tampón RPE y se centrifugó durante 2 min a $\geq 10\,000$ rpm. Se eliminó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo microtubo y se repitió el centrifugado durante 1 min a $\geq 10\,000$ rpm para eliminar cualquier resto de etanol.

2 2 7 La columna se transfirió a un microtubo de 1,5 mL y se añadió 50 μ L de agua libre de nucleasas directamente a la membrana de cada columna. Se centrifugó durante 1 min a $\geq 10\,000$ rpm.

2 2 8 El eluido conteniendo el RNA fue cargado nuevamente en la columna y se repitió el paso de centrifugado.

2 2 9 Cada RNA purificado fue dividido en tres alícuotas. Se midió la concentración de RNA y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

2.3 Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en el equipo NanoDrop 2000c de ThermoScientific. La pureza del RNA fue estimada determinando el ratio de la absorbancia 260nm y 280nm (A_{260}/A_{280}).

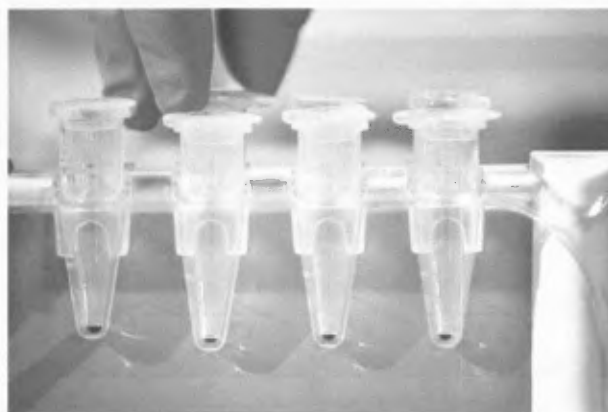


FIG. 3 Cuantificación del RNA

2.3.1 Purificación de mRNA

Para la purificación de mRNA se empleó el kit mRNA Isolation Kit (Roche cat. 11741985001) (Fig.2). 200 μ l de RNA total de los aislados a estudiar JB y 028 fueron añadidos en tubos eppendorf de 1.5ml con 200 μ l del buffer de lisis, se incubó 2min a 65°C. Se le agregó 150 μ l de las partículas magnéticas marcadas con estreptavidina (SMPs), se agitó con el vortex y luego se hibridizó con la sonda de oligo (dT)20 marcada con biotina, seguidamente se inmovilizó el híbrido-oligo dT-A biotinilado en una gradilla magnética, se lavó 3 veces y se eluyó el mRNA.

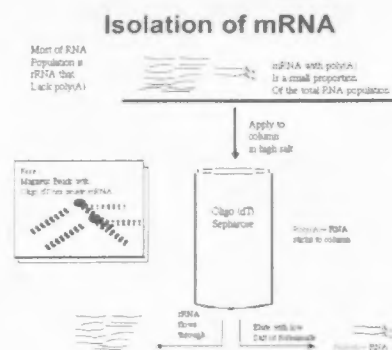


FIG. 4 Purificación de RNA

2.3.2 Evaluación de la calidad del RNA

La evaluación de la integridad del RNA total y mRNA se realizó mediante microelectroforesis capilar utilizando el kit RNA 6000 pico de Agilent en el equipo Bioanalyzer 2100. (FIG.3). La integridad de las muestras de RNA es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica mediante la tecnología de microarrays o de PCR en tiempo real. El Bionalizador 2100 permite la caracterización cualitativa y cuantitativa de muestras de RNA total o RNA mensajero (RNAm) basándose en los patrones de movilidad electroforética de las muestras en una matriz de gel que se introduce en unos chips formados por una serie de microcanales y depósitos en miniatura interconectados a través de los cuales migran electroforéticamente los ácidos nucleicos.



FIG. 5 Calidad de RNA

2.3.3 Tratamiento con DNasa

Todos los mRNA fueron tratados con DNase-1 grado amplificación, (Cat: 18068-015, Invitrogen), para eliminar DNA genómico.

2.3.4 Síntesis de cDNA a partir del mRNA

SuperScript® III Reverse Transcriptase CAT: 18080044 de Life Technologies.

2.3.4.1 Se utilizaron Random primers (RP) (Invitrogen), oligo dT primers de Live Technologies siguiendo las instrucciones del fabricante y primer específico de Alejandro Buschiazzi(AB). (Fig.4).



FIG. 6 Random primers (RP)
(Invitrogen)

Muestras utilizadas en todos los procesos con tres replicas c/u:

- | | | |
|--------------------------|---|---------------|
| 1- JB I mitad y II mitad | } | <i>TrSAS</i> |
| 2 - JB Gen completo | | |
| 3- 028 Imitad y II mitad | } | <i>TrSASi</i> |
| 4- 028 Gen Completo | | |

Primers específicos, diseñados para amplificar el gen de sialidasa de *Trypanosoma rangeli*. Los primers fueron diseñados para amplificar el gen completo desde el codón de inicio (ATG) hasta el codón de terminación, y un par adicional para amplificar la primera mitad y segunda mitad, para facilitar la secuenciación. La referencia para el diseño de los primers se tomó de la secuencia publicada por Alejandro Buschiazzi.

RTr-AB GCC ATC CGT GCC AAT CAT GTC




Reversa complementaria GAC ATG ATT GGC ACG GAT GGC

FTr-AB 5 CAC CAT GTC CTG GCT AGC GGT TTT C3



RTr AB-1/2 5 GTC AAA GAT GCG CTG ATT GTC 3

FTr AB-1/2 5 CAC CAT GCT CTT CAC CCA CCC GCT G3

Reacciones con los primers que utilizamos en cada PCR

Primera mitad		FTr AB + RTr AB-1/2
Segunda mitad		FTr AB 1/2 + RTr AB
Gen Completo		FTr AB + RTr AB

Para cada aislado se utilizaron 5 tubos Con todos los primers arriba indicado con una reaccion final de 20 µl en todas las Rx

1µl Random primers (250ng)  Oligodt 12 18 (500ng/µl)  Primers AB
1µl de mRNA (de c/d muestra)
1µl 10mM dNTPS
10µl H₂O
1µl SuperScript® III Reverse Transcriptase (200U/µl)

Se calentaba a 65°C x 5min Pasado el tiempo se incubo en hielo x 1min
Centrifugacion corta Se añade 4µl de First-Strand buffer 5x Seguido 1µl 0.1M

con 1µl de RNAase out mas 1µl la enzima Superscript III Reverse Transcription

Todo esto se incubo a 25°C x 5min

En el termociclador se puso a

Incubar a 50 C x 1hora

Inactivar la Rx calentando a 70 C

Incubar indefinido a 4°C

Cuando las Rx salian del termociclador se le agregaba a c/tubo RNasa H(Cat 18021071) a 37 C x 20min

3 PCR con ssDNA

3 1 Procedimiento

Se utilizaron las muestras de la sintesis de cDNA para la re-amplificacion se utilizo la enzima Platinum Taq DNA polimerasa High fidelity cat 11304011 de Invitrogen que es un sistema altamente robusto con capacidad de amplificar hasta 15kb que añade una A al final de la cadena mientras mantiene una alta fidelidad de la secuencia

Rx Platinum Taq High Fidelity 1X (50µl)

Reactivos	Volumen
H ₂ O	38.6µl
10x High Fidelity	5µl
50mM MgSO ₄	2µl
50mM Dntp	1µl
10mM Reverse primers	1µl
Template de DNA	1µl
Platinum High Taq Polimerase	0.4µl

Tabla 1 Reacciones que se utilizaron en todos los PCR que usamos la enzima Platinum High Taq Polymerase

Condiciones de la PCR

1-	94 C	→	2min	} 40 ciclos
2-	94°C	→	15 seg	
3-	57°C	→	30 seg	
4-	72 C	→	5min	
6	T = 72 C	⇒	7 min	
7-	HOLD 4 C			

3 3 1 Purificación de las secuencias amplificadas

Una vez amplificadas todas las secuencias (Gen completo primera mitad y segunda mitad del gen de Sialidasa) y verificada la presencia de bandas en el tamaño correspondiente a cada una se procedio a purificar cada producto mediante un gel de agarosa 1% de bajo punto de fusion en tampon TAE 1X

Se procedio a purificar los mismos para lo cual se hace una electroforesis en LMP (Promega Cat V2111) al 1% en TAE (Promega cat V4271) Los productos de PCR purificados utilizados a continuacion con el kit Wizard SV Gel and PCR clean up system cat A9282 Promega siguiendo el protocolo de purificación de productos de PCR por centrifugacion (Cuervo y col 2004)

Amplificado de secuencia que codifica el Gen Completo (Tamaño)
 1962 bp sin las dianas de las enzimas y A taling
 Primera mitad 1056
 Segunda mitad 996
 Fragmento que se superpone 90 bp
 Suma primera mitad + segunda mitad) menos fragmento superpuesto

3 3 1 2 Gel de agarosa de bajo punto de fusion Protocolo segun el fabricante Magnetis™ Proteins Purification System Cat V8558 (Promega) Las bandas

utilizadas se procesaron inmediatamente para evitar que se degradaran con la luz UV Para luego colocarlas en los tubos eppendorf previamente pesados para luego seguir con el protocolo que indicaba el fabricante para la purificacion

3 3 2 Purificacion de los productos de PCR

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System cat A9282 de Promega

3 3 3 Cuantificacion de la concentración de DNA de cada producto

La cuantificacion del DNA purificado se realizo por medida de la absorbancia a 260 nm Se utiliza en el Nanodrop

4 Clonacion

4 1 Vector

4 2 Ligacion

Para el proceso de clonacion se utilizo el vector de propagacion pGEM-T Easy (Promega) (Sanbrook J Russell DW 2006) Se hara la reaccion de ligacion con cada uno de los tres productos transformando celulas competentes JM109 Para la purificacion del plasmido se empleara Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) (Sanbrook J Russell DW 2006)

Reaccion de Clonacion

Standard Reaction			
Positive Control	Background Control		
2X Rapid Ligation Buffer	T4 DNA Ligase	5 µl	5µl
pGEM®-T or pGEM® T Easy Vector (50ng)		1µl	1µl
PCR product		Xµl*	-

5 Preparacion de medios de cultivo y soluciones de trabajo

5 1 Stock de ampicilina 10 mg/ml

5 2 Solucion stock IPTG 0 1 M

Se peso 1 2g de IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) se llevo a 50mL con agua destilada luego se esterilizo por filtracion (filtros de 0 22 μ m) Se prepararon alícuotas de 1 0mL y almacenar a -20°C

Stock 2M Mg²⁺

20 33 g MgCl₂ 6H₂O

Llevar a 100 mL con agua destilada Esterilizar por filtracion

Mg²⁺+stock solution 2M

101 5g MgCl₂ 6H₂O

123 3g MgSO₄ 7H₂O

Stock 2M glucosa

5 3 LB Broth

Reactivo	1000 ml	300 ml	Concentracion final
Tryptone	10 g	3 0 g	10 g/L
Extracto de levadura	5 g	1 5 g	5 g/L
NaCl	5 g	1 5 g	5 g/L

Autoclavar y dejar enfriar antes de guardar a 4°C

5 4 Agar LB

Reactivo	1000 ml	300 ml	Concentracion final
Tryptone	10 g	3 0 g	10 g/L (1 0 %)
Extracto de levadura	5 g	1 5 g	5 g/L (0 5 %)
NaCl	5 g	1 5g	5 g/L (0 5 %)
Agar	20 g	6 0 g	20 g/L (2 0 %)

Se autoclavo y se dejo enfriar a 50 °C antes de servir en las placas Petri
Se rotulo cada placa como LB

5 5 Agar LB con ampicilina 100 µg/mL

Reactivo	1000 ml	300 ml	Concentracion final
Tryptone	10 g	3 0 g	10 g/L (1 0 %)
Extracto de levadura	5 g	1 5 g	5 g/L (0 5 %)
NaCl	10 g	3 0g	10 g/L (1 0 %)
Agar	20 g	6 0 g	20 g/L (2 0 %)

Antes de añadir ampicilina el medio autoclavado debe estar a temperatura de 55°C con una concentracion final de 100 µg/mL

Volumen de ampicilina 10 mg/mL	Volumen final	Concentración final
1 0 mL	1000 mL	15 µg/mL
0 3 mL	300 mL	15 µg/mL

5 6 Agar LB con ampicilina/IPTG

Stock IPTG 0 1 M	Volumen final	Concentracion final
5 0 mL	1000 mL	0 5 mM
1 5 mL	300 mL	0 5 mM

Se prepararon todos los platos se rotularon se dejaron enfriar las placas sin la tapa para evitar la condensacion en la tapa Se guardaron a 4°C hasta su posterior uso

5 7 Medio SOC

Para 100 mL

Triptosa	2 0 g
Extracto de levadura	0 5 g
1 M NaCl	1 0 mL
1 0 M KCl	0 25 mL

2 M Mg ²⁺ esterilizado por filtracion	1 0 mL	20 mM concentracion final
2 M glucosa esterilizada por filtracion	1 0 mL	20 mM concentracion final

Llevar a 100 mL con agua esteril Verificar pH final 7 0

6 Transformacion

6 1 Preparacion de celulas competentes

Celulas JM 109 (cat L2001 Promega) Fueron las utilizadas para nuestro estudio antes de usarse las invertimos suavemente 3 veces ya que son muy delicadas Se tomo 50µl de estas celulas para mezclarlas con cada producto de ligacion Con su respectivo control pUC 19 Despues del choque termico con hielo baño maria a 42°C y hielo nuevamente se mezclan en un tubo falcon (15ml) de cada celula ligada con 950ul de medio SOC Se colocaron en un agitador a 37°C por un periodo de tiempo de 1h / 30 min a 150rpm

Ya lista la transformacion se platean 200ul x c/d tubo falcon de cada muestra en los platos de LB para luego incubar las a 37°C hasta el dia siguiente Y asi poder observar las colonias que habian crecido

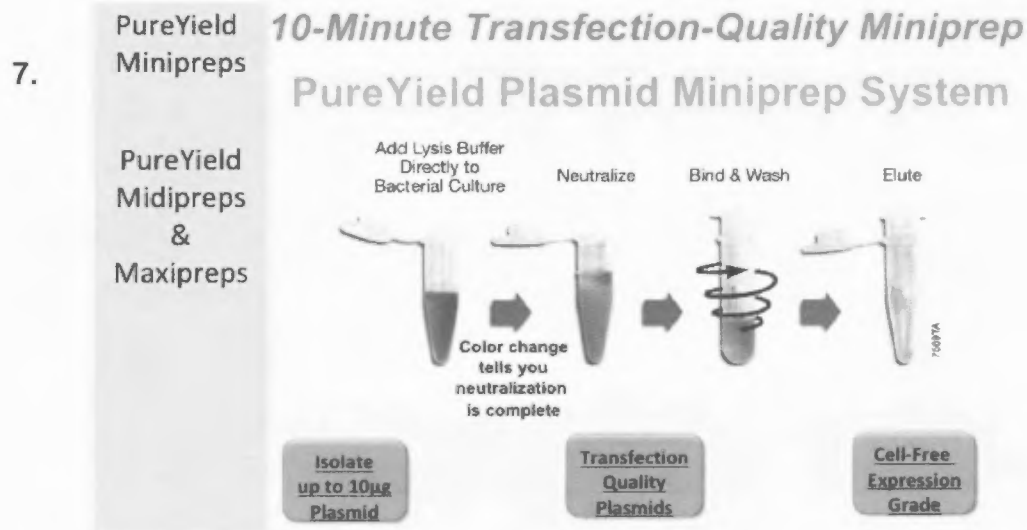
6 2 PCR de colonias

Para cada procedimiento de ligacion siempre se hizo un PCR (con las mismas condiciones anteriormente descritas) para comprobar que se dio la ligacion Los productos se diluan 1/10 antes de cada PCR

6 3 Preparacion de minipreps

PureYield Plasmid Minipreps cat A1222 Promega

Se escogieron para este proceso las colonias que crecieron mas separadas Se escogio la seccion 4C del Kits porque usamos 3 0ml del cultivo de las celulas transformadas Se le hizo PCR a todas las clones para comprobar que teniamos el plasmido



Secuenciación

Los productos de las PCR purificados de los parásitos que tienen actividad de sialidasa y de los que no tienen actividad, fueron secuenciados por el método de Dideoxi Nucleótidos marcados en el secuenciador automático 3130 genetic Analyzer, método de Sanger (Applied Biosystem) del Instituto Conmemorativo Gorgas, Sección de Proteómica y Genómica, empleando los iniciadores universales M13F y M13R, según la reacción descrita por Sanger, (1977) (Marañón y col. 2000b y Sanbrook y col. 2001) igualmente los cebadores diseñados para la amplificación del gen de la sialidasa (Buschiazzi y col. 1997).

A cada clon que obtuvimos, se procedió a hacerle sus respectivos cálculos para la reacción de secuenciación: BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit. Los primers que utilizamos fueron los M13Forward y M13 reverse.

Rx de Secuenciación	Rx (1)	M13 Forward (ul)	M13 Reverse (ul)
BigDye V3.1	Rx (1)	X5	X5
Primer	2.0 ul	10	10
Buffer	2.0 ul	15	15

Primer 5uM	1.0 ul	5	5
Templado 5uM	5.0 ul	-	-
H2O	9.0 ul	45	45
Volumen	20 ul		

Se utilizó 15 ul de c/u del mix. Se ajusto a 400ng del plásmido por Rx.

8. Análisis de resultados

El análisis de la homología de Nucleótidos y de aminoácidos se utilizo herramientas bioinformáticas tales como Blast en NCBI y EBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/index.html>, <http://www.ebi.ac.uk>).

Se seleccionaron las secuencias de los clones que se pudieron alinear.

Gen Precursor que utilizamos para comparar nuestras secuencias.

GI 2894809 *Trypanosoma rangeli* sialidase precursor gene, complete CDs
2,620bp genomic DNA. Clone: TrSA4. Accession: U83180.1GI: 2894809.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

RESULTADOS

1 MUESTRA

En nuestro proyecto de tesis utilizamos dos aislados de *T rangeli* suministrados por Centro de Investigaciones y Diagnostico de Enfermedades Parasitarias (C I D E P) Universidad de Panama Facultad de Medicina

-**JB** aislado de humano de la Provincia del oeste Distrito de Chorrera Altos del Jobo Con actividad enzimatica (TrSAS)

-**028** aislado de humano de la Provincia del Oeste Capira Cacao Sin actividad enzimatica (TrSASi)

Ambas cepas fueron comprobadas de su actividad enzimatica de la sialidasa (SA) y de su no actividad con la tecnica de M U N A N A (sustrato acido 2(4 methylumbelliferyl)- α - D-N-acetylneuraminic)

2 Extraccion de ARN

Para extraer el RNA total se uso el Kit RNeasy Mini Cat 74106 de Qiagen el cual emplea el principio de lisis con isotiocianato de guanidina seguido de la purificacion del RNA en columna de silice

El ARN total se aislo con el uso del kit RNeasy Mini Cada ARN purificado fue dividido en tres alicuotas se midio la concentracion de RNA con la ayuda del Nanodrop2000c de ThermoScientific Se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso

2 1 Cuantificacion de RNA

La cuantificacion del RNA se llevo a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en el equipo NanoDrop 2000c de ThermoScientific La pureza del RNA fue estimada determinando el ratio de la absorbancia 260nm y 280nm (A_{260}/A_{280})

1 RNA_{total} de JB (TrSAS) = 994 6 ng/ul

2 RNA_{total} de 028 (TrSAS_i) = 412 2 ng/ul

Mostrando mayor cantidad la cepa JB(TrSAS) que la 028 (TrSAS_i)

2 2 Purificacion de mRNA

Para la purificacion de mRNA se empleo el kit mRNA Isolation Kit Se siguio el procedimiento segun el fabricante Ya que el mRNA es muy inestable guardamos una alicuota a parte para cuantificarla con Ribogreen y evaluar la calidad con Agilent o del de agarosa ya que las demas alicuotas fueron utilizadas inmediatamente para el sintetizar cDNA

Antes de utilizar el equipo de Bioanalyzer le pusimos 350ul de agua libre RNase al electrodo de limpieza para hidratarlo antes y dejarlo secar x 30seg No debe haber rastros de RNase ya que nos degradara nuestros ARN

Nuestras muestras fueron en total 4

1- 028 RNA _{total}	412ng/ml	
2- JB RNA total	994 6ng/ml	
3- 028 mRNA	89 4 ng/ml	
4- JB mRNA	29 4 ng/ml	Ya purificados

Ambas muestras fueron tratadas con DNase I (18068-015) Tanto los RNA_{total} y los mRNA estaban libres de DNA genómico ya listos para proceder con la sintesis de cDNA

2 3 Sintesis de cDNA a partir del mRNA RT-PCR

Los mRNA fueron nuevamente tratados con DNase I para seguir corroborando que nuestras muestras no tenian contaminacion con DNA genómico

Para realizar el RT-PCR con SuperScript® III Reverse Transcriptase Utilizamos Random primers(RP) (50-250ng/μl) (Invitrogen) oligo dT (0 5ug/μl) primers de

Live Technologies y primer específicos y siguiendo las instrucciones del fabricante Se dispuso a hacer para c/d muestra 5 tubos y al final se le agrego a c/u 1ul de RNase H(Cat 18021071) a 37 °C x 20min

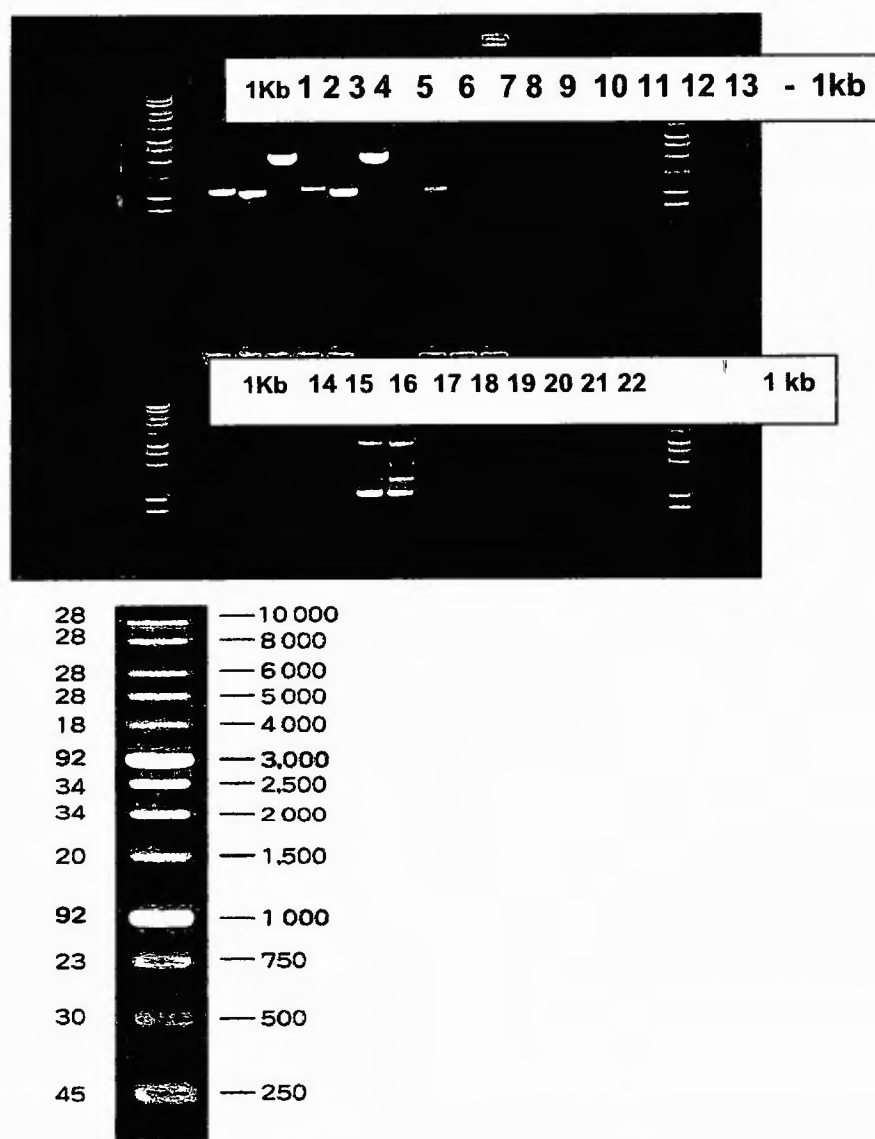


FIG 8 Muestras de cDNA de 028 y JB con Random primers Oligodt y primers específicos AB

Primera mitad	FTr-AB + RTr AB-1/2 \Rightarrow	Producto de 1056 pb
Segunda mitad	FTr AB-1/2 + RTr AB \Rightarrow	Producto de 996 pb
Gen Completo	FTr-AB + RTr AB \Rightarrow	Producto de 1962 pb

1	mRNA 028 I mitad AB
2	mRNA 028 I mitad RP
3	mRNA 028 II mitad AB
4	mRNA 028 gen CompletoAB
5	mRNA JB I mitadAB
6	mRNAJB II mitad AB
7	mRNAJB gen CompletoAB
8	ds 028 I mitad RP
9	ds 028II mitad RP
10	ds 028 gen completo RP
11	ds JB I mitad RP
12	ds JB II mitad RP
13	ds JB gen comp RP
14	mRNA 028 I mitad Oligodt
15	mRNA 028 II mitad Oligodt
16	mRNA 028 I mitad Oligodt
17	mRNA 028 II mitad Oligodt
18	mRNA 028 gen comp Oligodt
19	mRNA JB I mitad Oligodt
20	mRNA JB II mitad Oligodt
21	mRNA JB gen compppOligodt

Se escogieron solo las muestras amplificadas con los primers AB

Purificacion de las muestras amplificadas con kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system cat A9282

Ya escogidos los cDNA se procedio a purificar los mismos para lo cual hicimos primero un gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 100 V y otro gel de bajo punto de fusion low melting (LMP) a 1% TAE1X utilizando a el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system Las bandas que escogiamos siempre eran las mas separadas para evitar contaminacion con las mas cercanas teniendo en cuenta que se debe cortar rapido porque vimos que se nos degrada cDNA con la luz UV del

transluminador. Ya de aquí en adelante, trabajamos directamente, con el producto de la PCR, sin hacer el low melting, para así evitar, lo mencionado anteriormente.

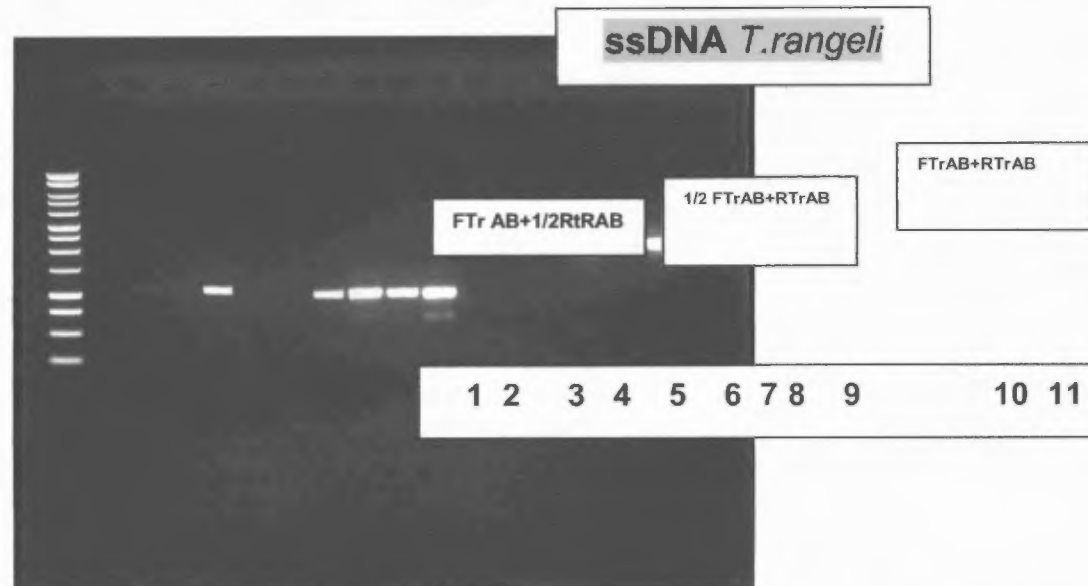


FIG. 9 Gel de agarosa al 1%, visualizando los cDNA, re-amplificados con Platinum Taq DNA polimerasa y libres de DNA genómico, para luego hacer el gel low melting, para cortar las bandas y purificarlas.

Las muestras que no nos salieron, usaremos los genes completos de las dos muestras, ya que si salieron todos.

4. Clonación

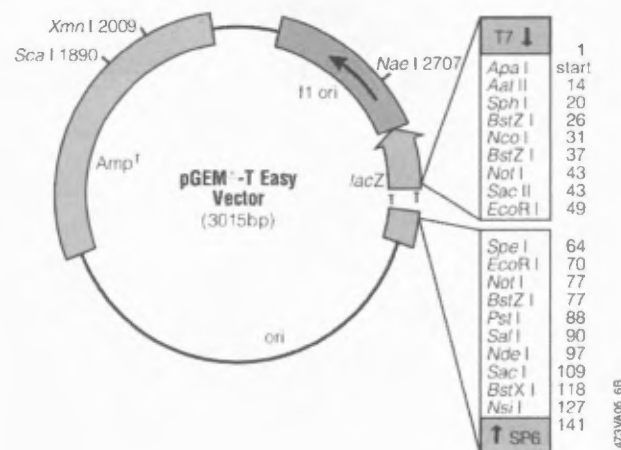


FIG. 10 vector de propagación, pGEM-T Easy (Promega)

4 1Vector

4 2 Ligacion

Para el proceso de clonacion se utilizo el vector de propagacion **pGEM-T Easy** (Promega) (Sanbrook J Russell DW 2006) Siguiendo el procedimiento del inserto Se hizo la reaccion de ligacion con cada uno de los tres productos transformando celulas competentes JM109 Para la purificacion del plasmido se empleo Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System seguimos el protocolo del fabricante

Antes de realizar todos estos pasos centrifugamos X 10min en el Eppendorf Vacufuge para concentrar nuestras muestras ya que necesitamos tener 150ng en 3ul siempre previo a la clonacion

Antes de hacer la Rx de ligacion ya deben estar listas las celulas competentes JM109

El dia anterior se prepararon los platos con LB con ampicilina para platear el resultado de la transformacion

El ultimo medio que se prepara antes de la transformacion es el SOC que le agregamos 1ml de Mg^{2+} y 1ml de Glucosa

La relacion para la ligacion con el vector fue de 3 1

I mitad

$$\underline{50ng) (1 056) \times 3} = 53ng \text{ de inserto}$$

3 0 (pGMTeasy)1

II mitad

$$\underline{50ng) (0 996) \times 3} = 49 8 \text{ de inserto}$$

3 0 (Vector pGMTeasy) 1

Gen completo

$$\underline{50ng) (1 962) \times 3} = 98 1 \text{ ng de inserto}$$

3 0 (pGMTeasy) 1

Reaccion de Clonacion

Standard Reaction

Positive Control

Background Control

2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase	5 µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1
PCR product	Xµl*		
Control Insert DNA	-	2µl	-
4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
nuclease-free water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

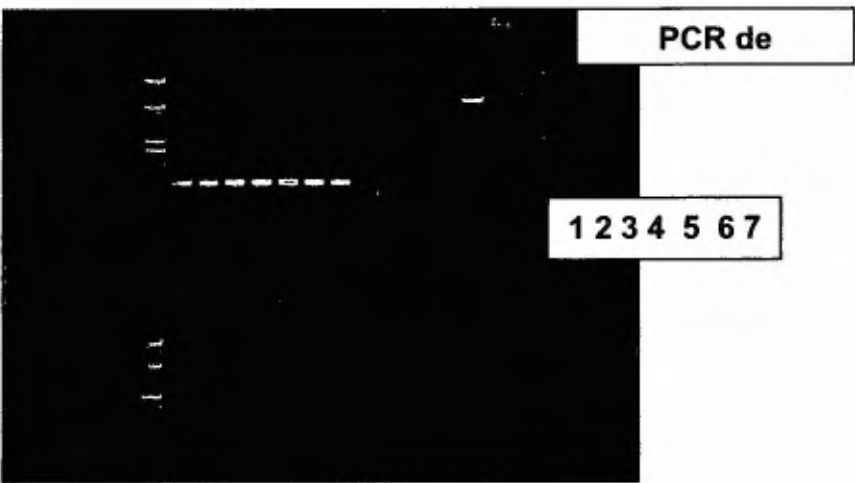


FIG 11 Productos de ligacion que muestra que esta el inserto en c/d producto

1 028 I mitad, 2 JB I mitad, 3 028 II mitad, 4 JB II mitad, 5 028 Gen completo
6 JB Gen completo, 7 Control de Ligacion

4 3 Transformacion

Se logro transformar nuestras células, competentes control, las JM109, que habían crecido, después de haberlas dejado overnight a 37°C. Le agregamos 50 µl de las JM109 transformadas, a c/d uno de nuestros productos de ligación, que habíamos obtenidos, después de dejarlo también, toda la noche, pero a 4°C. Todo ese proceso lo mantuvimos en hielo x 20 min, para preservar las JM109. Para luego darle, un choque térmico en un baño maría a 42 °C de 45 a 50 segundos y pasado ese tiempo lo pusimos en hielo nuevamente x 2 min. Al agregarle los 95 µl de SOC a temperatura ambiente, en tubos falcón de 15ml a los 900 µl, de las células ya transformadas y la dejamos por 1h: 30min, en un agitador a 150rpm a 37°C. Ya pasado el tiempo, en un plato de LB con ampicilina, colocamos 100ul para platearlos y lo dejamos incubando por 24hrs a 37°C. Transcurrido el tiempo, fuimos sacando los platos con colonias y las guardamos a 4°C. Hasta su posterior uso.

Se separaron las colonias más aisladas, y sembradas en otros platos de LB, hasta 4 cuadrantes, por colonias, para así tener clones separados, para luego escoger, otra colonia igual, la más aisladas, para hacerle el Minipreps a c/u.

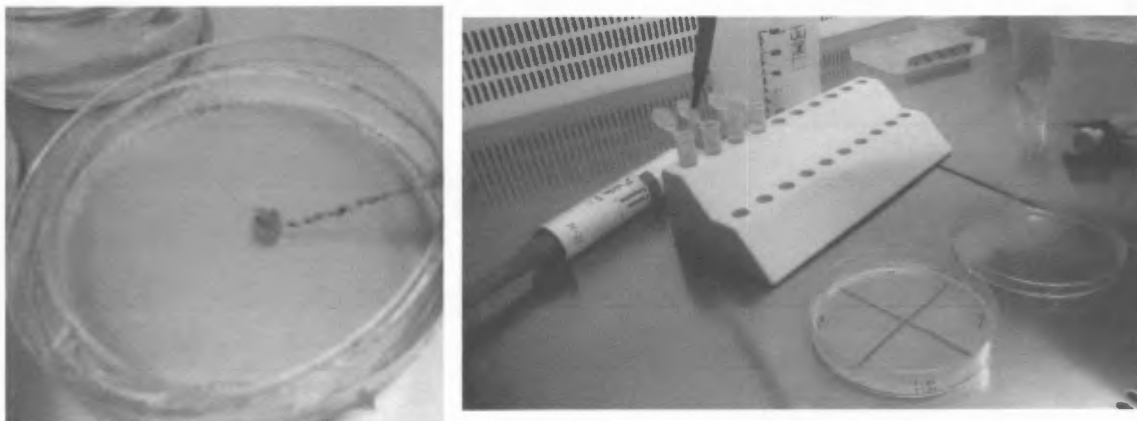


FIG. 12 Tubos eppendorf con clones ya separados para sembrar. Platos Petri, plateando las células transformadas.



**Clon 1
028 I mitad**

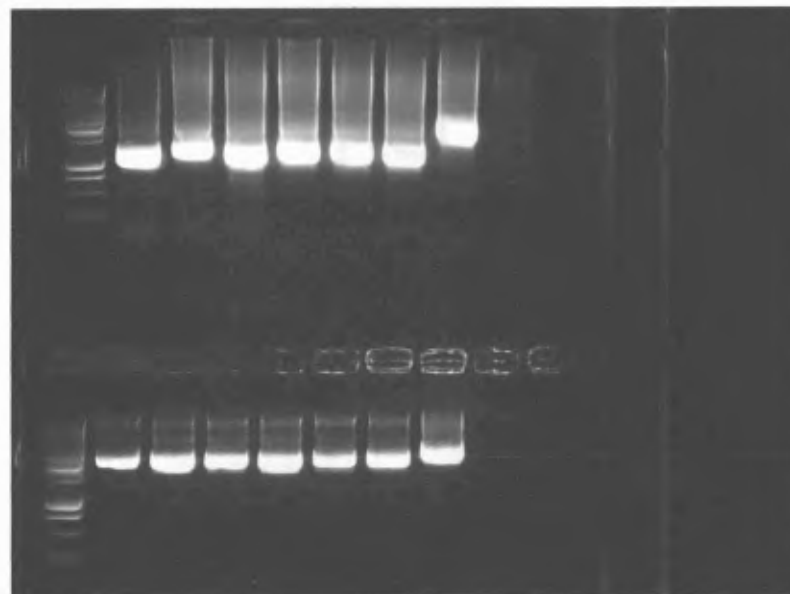
FIG. 13 Cultivo de clones de células transformadas

5. Preparación de Minipreps

En este paso, decidimos utilizar la sección 4 C del kit PureYield Plasmid Minipreps. Antes de hacer este paso, pusimos a crecer una colonia aislada de c/u de los clones de c/d aislado, en 5 ml de medio LB con ampicilina, toda la noche en agitador a 37°C. Antes de hacer el Minipreps, verificamos con un PCR con los primers M13, si en realidad nuestras células están transformadas.

La alícuota que usamos, para este proceso fue de 600µl, y se seguimos el protocolo del fabricante. Variamos al final, ya que eluimos con H₂O nanopure, en vez de TE, que viene dentro del kit, ya que pudimos comprobar que obtenemos, menor cantidad de plásmido, al cuantificar nuestro plásmido en la Nanodrop.

PCR de Miniprep con M13 de Clones de 028



GEL DE MINIPREPS DE PCR CON M13

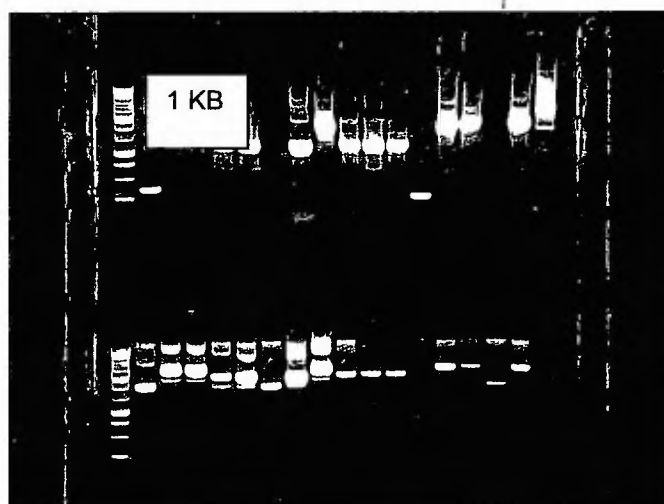


FIG 15 30 clones de ambos aislados se verificaron con una PCR con la PlatinumTaq Polymerasa para visualizar si tenian el plasmido

6 Secuenciacion

Luego de haber confirmado mediante un PCR con los primers M13 y visualizados con una electroforesis de un gel agarosa al 1% que los fragmentos clonados correspondian a un fragmento del gen sialidasa en cada uno de nuestros aislados 028 (**TrSAS_I**) y **JB (TrSAS)** Se procedio a realizar la Secuenciacion de cada uno de los 15 clones seleccionados en el el secuenciador automatico 3130 genetic Analyzer metodo de Sanger (Applied Biosystem) Es asi como muestra la tabla 2

A cada clon que obtuvimos se procedio a hacerle sus respectivos calculos para la reaccion de secuenciacion BigDye® Terminator V3 1 Cycle Sequencing Kit Los primer que utilizamos fueron los M13Forward y M13 reverse Se utilizo 15µl de c/u del mix Se ajusto a 400ng del plasmido por Rx

Vale la pena resaltar que las secuencias obtenidas en este trabajo se derivan de productos de PCR amplificados mediante las enzimas Platinum Taq DNA Polymerasa High Fidelity cat 11304011 de Invitrogen y Platinum Taq DNA Polymerasa que tiene como ventaja la actividad correctora de lectura Proofreading sumada a la actividad polimerasa Los productos asi amplificados

fueron clonados en el plasmido pGEM®-T Easy Por lo anterior los datos obtenidos son confiables libres de ADN genómico y representan una secuencia consensos de c/d una de los aislados utilizados en este trabajo

Aislado 028 no tiene actividad enzimática de sialidasa (TrSAS_I)

Aislado JB tiene actividad enzimática de sialidasa (TrSAS)

CLON	AISLADO	FRAGMENTO
1	028	I MITAD
2	028	I MITAD
3	028	II MITAD
4	028	II MITAD
7	028	GEN COMPLETO
33	028	GEN COMPLETO
34	028	GEN COMPLETO
66	JB	I MITAD
70	JB	I MITAD
72	JB	I MITAD
6	JB	II MITAD
35	JB	II MITAD
36	JB	II MITAD
38	JB	II MITAD
41	JB	GEN COMPLETO
98	JB	GEN COMPLETO
104	JB	GEN COMPLETO

TABLA 2 Clones seleccionados para hacer las secuencias requeridas

8 Analisis de resultados

Para realizar los analisis bioinformaticos en primer lugar se procedio a revisar y editar las secuencias obtenidas Para ello se eliminaron los fragmentos contaminantes pertenecientes al plasmido de clonacion mediante analisis BLAST-N y ubicacion de los iniciadores Posteriormente se realizo un

alineamiento entre las secuencias obtenidas con ambos iniciadores, luego de invertir y complementar la secuencia obtenida con la del iniciador M13 reverso (M13R). Finalmente, se obtuvieron las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y la búsqueda de homología fue realizada usando los programas ALIGN (Pearson & Lipman, 1988) y BLASTN(Stephen y col , 1997) .El análisis de la homología de Nucleótidos y de aminoácidos se utilizó herramientas bioinformáticas tales como Blast en NCBI y EBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/index.html>),

En primer lugar, se corroboró la identidad de los fragmentos clonados mediante comparación con las secuencias reportadas en las bases de datos NCBI usando la herramienta BLAST-N (www.ch.embnet.org) (Stephen et al., 1997) con secuencias consensos, que se hicieron de la unión de c/u de los clones, correspondientes a los tres fragmentos secuenciados de c/u de los aislados estudiados. Eecontrándose una identidad del 99, %, con el gen precursor de la Sialidasa reportada por Alejandro Buschiazzo, (1997), (Pero no así a nivel de a.a, ya que se observó, una diferencia de cuatro aminoácidos (a.a), en posiciones diferentes con respecto al gen precursor U83180.1GI. Como lo mostramos en la tabla 3.

CEPA	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs
028	215pb	623pb	1182	1882
CONSENSOS	C → T	G → C	C → G	A → G
JB				
CONSENSOS	C → T	G → C	C → G	A → G
	NO	NO SINONIMA	NO	NO
	SINONIMA	TRANSVERSION	SINONIMA	SINONIMA
	TRANSICION		TRANSICION	TRANSICION

TABLA 3. Cambios en los ORFs, con respecto al gen precursor U83180.1GI. Pero observándose que no existe diferencias entre las dos secuencias consensos estudiadas- Consensos desde 332pb hasta 1983pb.

No sinónima quiere decir que no codifica para el mismo a.a.

Una Purina + Purina = Transición

Una Purina + Pirimidina= Transversión

Significados de los cambios observados en los consensos con respecto a el gen precursor

Primer cambio= 215 pb = Treonina x Isoleucina

Segundo cambio= 623pb = Glicina x Alanina

Tercer cambio = 1182pb = Fenilalanina x Leucina

Cuarto cambio = 1882 pb= Isoleucina x Valina

A la vez se pudo contemplar que entre las dos secuencias consensos que entre ellas son identicas a nivel de ORFs

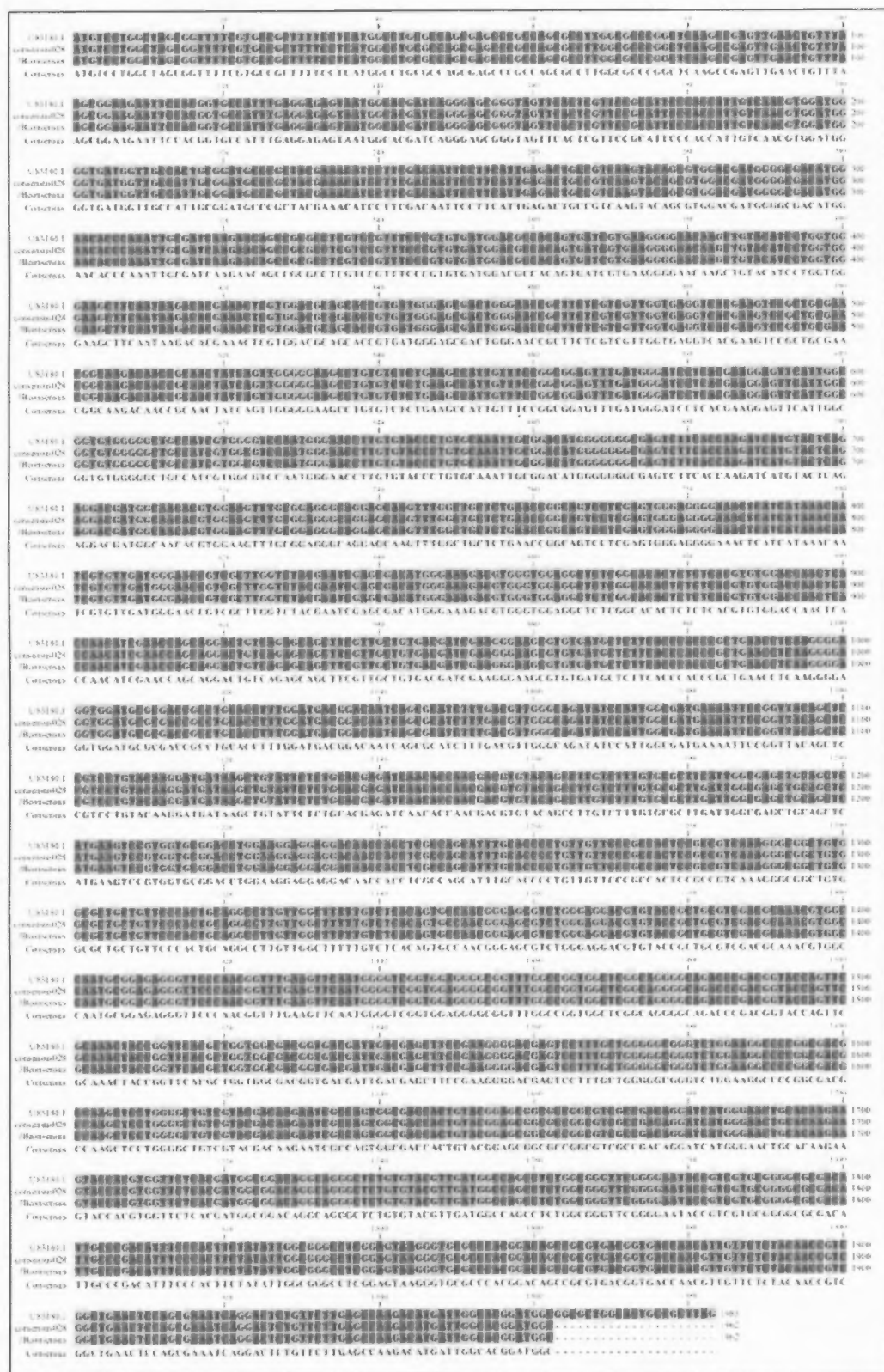


FIG. 16 Secuencias nucleotídicas de los consensos de 028 y JB, comparándola

con el gen precursor de sialidasa

U83180 1GI Observandose la identidad (99%) y los cambios en las posiciones de los nucleotidos resaltados con colores diferentes-

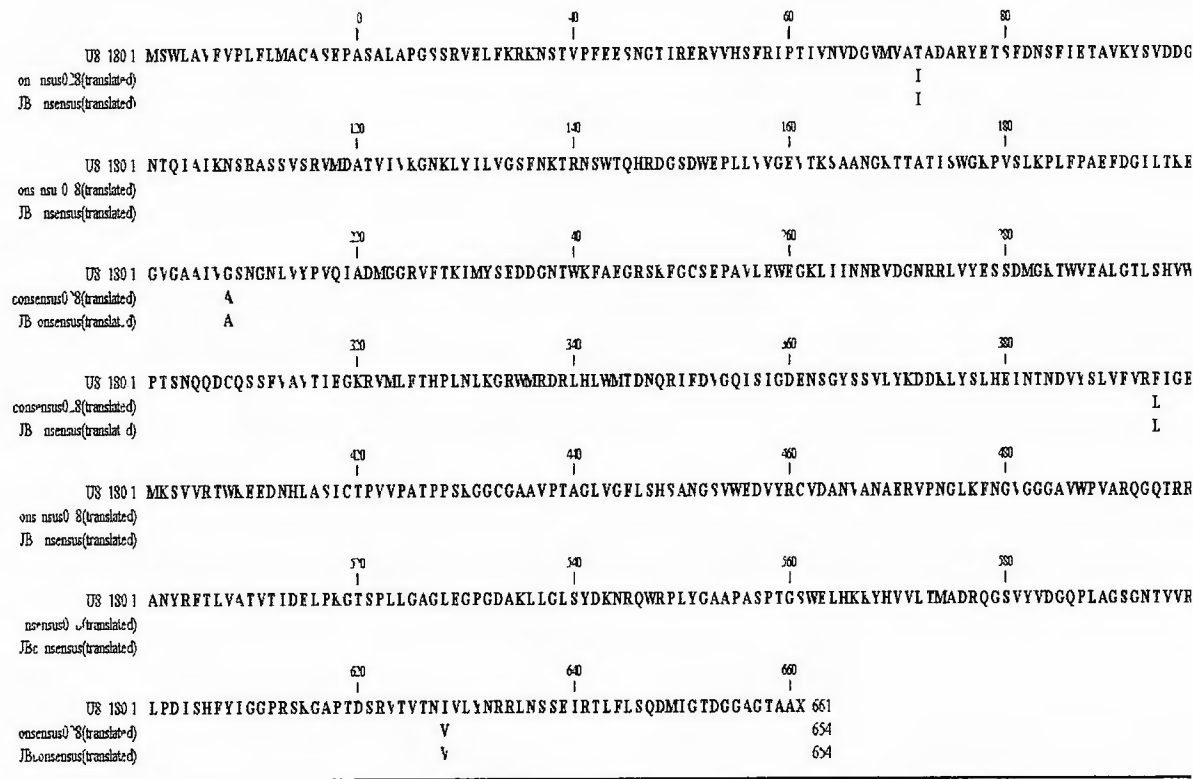


FIG 17 Secuencias de aminoacidos con respecto a nuestros dos consensus (028 y JB) comparandola con el gen precursor

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores naturalmente infectados ha sido objeto de estudio debido a que en las infecciones intestinales existen flagelados indiferenciables entre sí de manera que en algunas infecciones se identifica la presencia de una de las dos especies pero no se puede confirmar o descartar la presencia de la otra (Vallejo y col 1988) Pereira y Moss (1985) informaron que cultivos de *T. rangeli* epimastigotes produce neuraminidasa en cantidades fácilmente detectables Esta enzima llamada sialidasa (SA) se convierte así en un importante marcador bioquímico que conduce a que las 2 especies de flagelados puedan ser diferenciadas-

Los avances recientes en los estudios de transcripción genómica de *T. rangeli* y su comparación con *T. cruzi* constituyen el punto de partida para entender cabalmente la transmisión vectorial selectiva de *T. rangeli* y *T. cruzi* así como de la patogenia de *T. r* para el vector y de la incapacidad de este y la capacidad de *T. c* para invadir células del mamífero (Vallejo y col 2015)

Por todo lo mencionado anteriormente nuestro presente estudio ha tratado de proporcionar una base en cuanto a la actividad enzimática y la no actividad de la Sialidasa (SA) en cepas o aislados presentes en la Provincia de Panamá y Oeste teniendo como principal objetivo Secuenciar a nivel transcriptómico del gen de la Sialidasa (SA) de aislados de *Trypanosoma rangeli* que tienen y no tienen actividad enzimática Los aislados que utilizamos fueron dos uno con TrSA_i 028 y el otro TrSA_{JB} que con la técnica M U N A N A medimos su actividad y su no actividad (O Sousa y col 2005) Cosechadas en su fase exponencial en día 12 fue para nosotros muy efectiva Se extrajo su pellet de c/u para realizarle todas las técnicas moleculares anteriormente descritas

En cuanto que Medina-Acosta y colaboradores (1994) la evaluación de la expresión de las actividades de la TSA y SA en el Kinetoplastida protozoos reconocen cuatro tipos de expresiones Tipo I con niveles comparables de TSA y

SA (*Endotrypanum* y *T. lewisi*) Tipo II que expresa la actividad predominantemente TSA (*T. cruzi* y *T. conorhini*) Tipo III parásitos que expresan la actividad exclusivamente SA (*T. rangeli* y *T. leeuwenhoekii*) y Tipo IV parásitos no expresan bien la actividad (*Leishmania* y *Trypanoplasma borreli*) Se considero que dicha interpretacion permite la diferenciacion de los parásitos frecuentes y encuentra en la naturaleza (es decir el *T. cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania* / *Endotrypanum*)

Los mRNA extraídos de nuestras muestras fue cuidadosamente constatado que estaban libre de DNA genómico con el uso de DNase I (18068-015) ya que nos interferiria mucho en nuestros resultados

A la vez empleamos para el RT PCR una enzima muy eficiente en la SuperScript® III Reverse Transcriptase la Platinum High Taq Polimerase con un juego de primers Random primers (RP) (Invitrogen) oligo dT primers de Live Technologies y primeros específicos de Alejandro Buschiazzi (AB) se probaron todos los primers para tratar de tener una buena cantidad de cDNA La transcripcion reversa genera una copia de la hebra de RNA pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodologia PCR (Martinez 2004)

Cada PCR se trataban las muestras con DNase out Las condiciones de las PCR se mantuvieron en todas las pruebas

Purificacion de las muestras amplificadas con kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system

Las bandas que escogiamos siempre eran las mas separadas para evitar contaminacion con las mas cercanas teniendo en cuenta que se debe cortar rapido porque vimos que se nos degradaba la muestra En la figura 6 se observo que la primera mitad de 028 solo marco una en esta parte decidimos trabajar con el gen completo de 028

Clonacion, ligacion y transformacion

En estos procesos siempre comprobando que teníamos el producto de cada aislado y que estuviera nuestro inserto en las células utilizadas. Como se muestran en la figura 8 se ven claramente las bandas de cada fragmento necesario.

Gen Completo (Tamaño)

1962bp sin las dianas de las enzimas y A tailing

Primera mitad 1056

Segunda mitad 996

Fragmento que se superpone 90bp

Suma primera mitad + segunda mitad) menos fragmento superpuesto

$$(1056 + 996) - 90 = 1962$$

Cuando se procedía a platear las células transformadas se debía de sembrar con rayados un poco separados para que nuestras colonias crecieran separadas y así poder tomar bien la colonia.

Preparación de Minipreps

En este paso decidimos utilizar la sección 4 C del kit PureYield Plasmid Minipreps. Antes de hacer este paso pusimos a crecer una colonia aislada de c/u de los clones de c/d aislado en 5 ml de medio LB con ampicilina toda la noche en agitador a 37 °C. Antes de hacer el Miniprep verificamos con un PCR con los primers M13 si en realidad nuestras células están transformadas. En las figuras 11 y 12 se puede demostrar que nuestros plásmidos estaban presentes ya que se verificaron con una PCR con la PlatinumTaq Polimerasa.

se verificaron con una PCR con la PlatinumTaq Polimerasa. Solo 15 clones fueron seleccionados para secuenciar.

En muchos estudios de los proyectos del genoma humano y de otros organismos ha puesto de manifiesto que los marcos abiertos de lectura (ORFs) codificantes para productos proteicos constituyen el 1.5 % del genoma, los cuales además no exhiben diferencias significativas con especies similares. Por lo tanto, el 98.5 % restante del genoma que se compone de regiones intergenicas, secuencias

reguladoras secuencias repetitivas y ARN En tripanosomatidos la mayoría de los genes codificantes para proteínas se organizan en tandem y se transcriben de forma policistronicas (Thomas y col 1993) no codificantes para proteínas cobra importancia en este sentido (Zemann et al 2006) Como consecuencia en tripanosomatidos la regulación de la expresión génica no es controlada durante el inicio de la transcripción sino de forma post-transcripcional a través del procesamiento estabilidad localización y traducción de los ARNs mensajeros (Nozaki & Cross 1995) De esta manera las regiones no codificantes localizadas entre los diferentes marcos de lectura o regiones intergénicas se han visto implicadas en los mecanismos de regulación de la expresión génica que operan tanto a nivel post-transcripcional como traduccional

Secuenciación

Vale la pena resaltar que las secuencias obtenidas en este trabajo se derivan de productos de PCR amplificados mediante la enzima Platinum Taq DNA Polymerasa High fidelity cat 11304011 de Invitrogen y Platinum Taq DNA Polymerasa que tiene como ventaja la actividad correctora de lectura Proofreading sumada a la actividad polimerasa Los productos así amplificados fueron clonados en el plasmido pGEM®-T Easy Por lo anterior los datos obtenidos son confiables libres de ADN genómico y representan una secuencia consensos de c/d una de los aislados utilizados en este trabajo

Con los resultados de Secuenciación de las dos cepas de *T rangeli* 028 TrSA₁ y JB TrAS y la consignada en la base de datos del GenBank GI 2894809 *Trypanosoma rangeli* sialidase precursor gene complete cds 2 620bp genomic DNA Clone TrSA4 Accession U83180 1GI 2894809) No mostraron entre ellas ninguna diferencia son idénticas entre ellas A la vez revelaron una identidad del 99 % con el gen precursor de la Sialidasa reportada por Alejandro Buschiazzi (1997) Pero no así a nivel de a a ya que se observó una diferencia de cuatro aminoácidos (a a) en posiciones diferentes con respecto al gen precursor U83180 1GI Como lo mostramos en la tabla 3 que se observa 4 cambios

- 1- En posici3n 215pb C-----T = Una transici3n no sin3nima
 Treonina por Leucina
- 2- En posici3n 623pb G-- --C = Una Transversion no sin3nima
 Glicina por Alanina
- 3- En posici3n 1182pb C-----G= Una Transici3n no sin3nima
 Fenilalanina por Leucina
- 4 -En posici3n 1882b A-- --G = Una Transici3n no sin3nima
 Isoleucina por Valina

Todo esto nos parece indicar que se esta transcribiendo RNA que codifica para sialidasa en los dos aislados iguales con el mismo mensaje

Pero nuestras dos secuencias consensos muestran diferencias con la que ha reportado como activa anteriormente por A Buschiazzo Lo que indica que hay una diferencia de 4 a a-

En tanto que la figura 13 nos indica la secuencia de nucle3tidos en la posici3n indicada arriba Tanto que la figura 14 es una secuencia de aminoacidos que nos resalta la posici3n donde ocurre el cambio de aminoacidos

Las regiones intergenicas de tripanosomatidos constituyen por lo tanto un blanco inherente de estudio a pesar de no tener funci3n codificante para productos proteicos Es as3 como por ejemplo Brandao & Fernandez (2006) demuestran como la regi3n 3 no traducida (la cual hace parte de la regi3n intergenicas o espaciadora) de los genes codificantes para la calmodulina acumula mutaciones entre los diferentes linajes de T cruzi que hacen posible su distinci3n utilizando metodos filogeneticos

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- En nuestro trabajo de investigación de los dos aislados utilizados (028 TrASi y JBTrAS) se pudo obtener 15 clones. Con secuencias alineadas de 120 que sembramos
- Las secuencias de 028 y JB del cDNA son idénticas
- Sin embargo hay 4 sustituciones no sinónimas que llevan a cambios de 4 posiciones cuando la comparamos con la sialidasa reportada como activa por Alejandro Buschiazzo
- Al comparar la secuencia de sialidasa del A Buschiazzo(U83180 1), con las de los aislados 028 TrASi y JBTrAS presentan 99% de identidad

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Ayala C Arevalo A Urrea D Garcia J Yara D Lozano L Carranza J y Vallejo G 2001 Caracterizacion antigenica de cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas en ciclos de transmision domestica y silvestre en areas endemicas de Colombia Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biologicas
- Basso B Moretti E Fretes R 2008 Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection Mem Inst Oswaldo Cruz **103** 370-374
- Buschiazzo A y Frasch A 2012 Obtencion de mutante con actividad de sialidasa a partir de la trans sialidasa de *Trypanosoma cruzi* Instituto de Investigaciones de Biotecnologias San Martin Buenos Aires Short communication
- Buschiazzo A et al 2000 Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases Embo J 19(1) 16-24
- Buschiazzo A Campetella O Frasch A 1997 *Trypanosoma rangeli* sialidase cloning expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase Glycobiology **7** 1167-1173
- Buschiazzo A Cremona ML Campetella O Frasch AC Sanchez DO 1993 Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* transsialidase Mol Biochem Parasitol **62** 115-116
- Buschiazzo A Tavares GA Campetella O Spinelli S Cremona ML Paris G Amaya MF Frasch AC Alzari PM 2000 Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases EMBO **19** 16-24
- Cremona JVL Sanchez D O Frasch A C C and Campetella O (1995) A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* transsialidases Gene **160** 123-128

- Cuba y colaboradores 1998 Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Rev Soc Bras Med Trop 31 207-220
- Franz C K Rutishauser U and Rafuse V F J 2005 Neurosci 25 2081–2091
- Frasch AC 2000 Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi* Parasitol Today 16(7) 282-286
- Gaston Paris y col 2005 A Sialidase Mutant Displaying trans Sialidase Activity Laura Ratier Maria Fernanda Amaya Tong Nguyen Pedro M Alzari and Alberto Carlos Frasch J Mol Biol 345 923-34
- Grisard EC y colaboradores 2010 Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli* Mol Biochem Parasitol Nov 174(1) 18-25
- Guhl F Jaramillo c Carranza JC Vallejo g 2002 Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T rangeli* Arch Med Res 33 362-70
Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T rangeli* Arch Med Res 2002 33 362-70
- Horna Aura 1992 Biochemical and Immunological Characteristics of *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920) Strains affecting rural populations of Central and South America Karolinska Institute KIRT Program Stockholm Suecia
- Horna A E Saldaña A Sousa O E and Om A 1996 *Trypanosoma rangeli* Biochemical characterization of five stocks from different geographical areas Mem Inst Oswaldo Cruz incompleta
- Marini V Moretti E Bermejo D Basso B 2011 Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic level in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection Mem Inst Oswaldo Cruz 106 32-37

- Medina-Acosta E Franco AM Jansen AM Sampol M Neves N Pontes-de-Carvalho L Grimaldi Junior G Nussenzweig V 1994 Transsialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids Eur J Biochem 225 333-339
- Octavio E Sousa¹ Mantza Lombardo Azael Saldaña 2005 *Trypanosoma rangeli* sialidase: lack of activity in stocks from Panama and other regions Center for Research and Diagnosis of Parasitic Diseases Faculty of Medicine University of Panama Republic of Panama GENERAL BIOLOGY SHORT COMMUNICATION incompleta
- Palau MT Mejia AJ Vergara U Zuñiga CA 2003 Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations Mem Inst Oswaldo Cruz 98(4) 543-8

ANEXOS